



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|--|-----------|---|
| (51) Classification internationale des brevets⁵ : C07K 13/00, C12N 15/12 G01N 33/68 // G01N 33/574 | A2 | (11) Numér de publication internationale: WO 90/00179 (43) Date de publication internationale: 11 janvier 1990 (11.01.90) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR89/00348 (22) Date de dépôt international: 4 juillet 1989 (04.07.89) (30) Données relatives à la priorité: 88/09031 4 juillet 1988 (04.07.88) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TAVITIAN, Armand [FR/FR]; 235, rue Lafayette, F-75010 Paris (FR). PIZON, Véronique [FR/FR]; 9-11, rue Letellier, F-75015 Paris (FR). CHARDIN, Pierre [FR/FR]; 94, rue Broca, F-75013 Paris (FR). | | (74) Mandataire: S.C. ERNEST GUTMANN YVES PLASSE-RAUD; 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i> |
| (54) Title: NOVEL PROTEINS, DNA CODING FOR SAID PROTEINS, AND THEIR USE (54) Titre: NOUVELLES PROTEINS, ADN LES CODANT ET LEUR USAGE (57) Abstract <p>Novel amino-acid sequences containing at least one of the following amino acid chains: MREYKLVVL (I), ALTQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEIL (II), QFTAMRDLYMKNQGQGFALVYSITAQSTFNDLQDLREQILRVKDTEDVPM (III), EDERVVGKEQGQNLARQWCNCAFL (IV), SKINVNEIEYDLVRQINRKTPVEKKKPKKKSCLLL (V), ALTQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEIL (VII), QFTAMRDLYMKNQGQGFALVYSITAQSTFNDLQDLREQILRVKDTDDVPMI (VIII), EDERVVGKEQGQNLARQWNNCAFL (IX), SKINVNEIFYDLVRQINRKTPVPGKARKKSSCQLL (X), MREYKVVVL (XI), ALTQFVTGTFTIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSPSVLEIL (XII), QFASMRDLYIKNGQGFIYVSLVNQQSFQDIKPMRDQIIRVKRYEKVPVI (XIII), ESEREVSSEGRALAEWGCPEFM (XIV), SKTMVDELFAEIVRQMNYAAQPDKDDPCCSACNIQ (XV). Said amino-acid sequences can be used for <i>in vitro</i> diagnosis of pathologies linked with oncogenic factors.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet de nouvelles séquences d'acides aminés contenant l'un au moins des enchaînements d'acides aminés suivants: MREYKLVVL (I), ALTQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEIL (II), QFTAMRDLYMKNQGQGFALVYSITAQSTFNDLQDLREQILRVKDTEDVPM (III), EDERVVGKEQGQNLARQWCNCAFL (IV), SKINVNEIEYDLVRQINRKTPVEKKKPKKKSCLLL (V), ALTQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEIL (VII), QFTAMRDLYMKNQGQGFALVYSITAQSTFNDLQDLREQILRVKDTDDVPMI (VIII), EDERVVGKEQGQNLARQWNNCAFL (IX), SKINVNEIFYDLVRQINRKTPVPGKARKKSSCQLL (X), MREYKVVVL (XI), ALTQFVTGTFTIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSPSVLEIL (XII), QFASMRDLYIKNGQGFIYVSLVNQQSFQDIKPMRDQIIRVKRYEKVPVI (XIII), ESEREVSSEGRALAEWGCPEFM (XIV), SKTMVDELFAEIVRQMNYAAQPDKDDPCCSACNIQ (XV). Ces séquences d'acides aminés peuvent être utilisées pour le diagnostic <i>in vitro</i> de pathologies liées à des facteurs oncogènes.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|-----------------------------------|----|---|----|-----------------------|
| AT | Autriche | FI | Finlande | ML | Malï |
| AU | Australie | FR | France | MR | Mauritanie |
| BB | Barbade | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BE | Belgique | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BF | Burkina Fasso | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BG | Bulgarie | IT | Italie | RO | Roumanie |
| BJ | Bénin | JP | Japon | SD | Soudan |
| BR | Brésil | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède |
| CF | République Centrafricaine | KR | République de Corée | SN | Sénégal |
| CG | Congo | LJ | Liechtenstein | SU | Union soviétique |
| CH | Suisse | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| CM | Cameroun | LU | Luxembourg | TG | Togo |
| DE | Allemagne, République fédérale d' | MC | Monaco | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark | MG | Madagascar | | |
| ES | Espagne | | | | |

NOUVELLES PROTEINES, ADN LES CODANT ET LEUR USAGE

5

L'invention a pour objet de nouvelles séquences d'acides aminés, les acides nucléiques codant pour ces séquences d'acides aminés et leurs applications, notamment pour le diagnostic, in vitro, de pathologies liées à l'action de facteurs oncogènes.

On connaît des protooncogènes tels que H-ras, K-ras et N-ras (De Feo et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 3328-3332; Ellis et al., (1981), Nature, 292, 506-511 ; Shimizu et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 383-387) et on a identifié de nouveaux gènes dans une grande variété d'organismes sur la base de leur homologie avec le gène ras des mammifères.

Dans les mammifères, les protéines codées par ces gènes voisins des gènes ras (ral, R-ras, rho et rab) présentent 50 à 30 % d'homologie avec les protéines ras (Chardin et al., (1986) EMBO J., 5, 2203-2208 ; Madaule et al., (1985) Cell, 41, 31-40 ; Touchot et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 8210-8214).

Les protéines ras et les protéines voisines des protéines ras présentent des poids moléculaires d'environ 21 000 à 24 000 d.

Les protéines ras sont actives lorsqu'elles sont associées au GTP (Guanosine 5'-triphosphate) et sont inactives lorsqu'elles sont associées au GDP (Guanosine 5'-diphosphate) et l'hydrolyse du GTP a lieu par action de leur faible activité intrinsèque GTPase (Papageorge et al., (1982) J. Virol., 44,

509-519 ; Mcgrath et al., (1984) Nature, 310, 644-649).

5 Les protéines ras transformantes détectées dans les tumeurs humaines présentent très fréquemment une substitution des amino acides localisés dans le domaine de liaison du GTP, en position 12, 13 ou 61 (Barbacid (1987) Annual Review of Biochemistry, 56, 779-827).

10 Ce domaine joue un rôle essentiel dans la régulation des propriétés biologiques des protéines ras.

Le site de liaison du GTP consiste en quatre régions non contiguës qui appartiennent à toutes les protéines ras.

15 Parmi ces régions, six amino acides : DTGAQE en position 57 à 62 de la protéine K-ras, semblent être une caractéristique de la protéine ras et de toutes les protéines ras voisines (Chardin et al., (1986) EMBO J., 5, 2203-2208 ; Touchot et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 8210-8214). Ces six résidus sont strictement conservés dans les protéines ras, ral et rab.

20 Dans les protéines H-ras, on a trouvé (Der et al., (1986) Cell, 44, 167-176) que pratiquement chaque mutation du résidu en position 61 de la protéine ras est corrélé à l'acquisition du potentiel transformant.

25 Or, la Demanderesse a trouvé de nouvelles séquences d'acides aminés, parmi lesquelles la position 61 est une threonine, et qui cependant ont des propriétés non transformantes.

30 L'un des aspects de l'invention est de proposer de nouvelles séquences d'acides aminés, ayant la

capacité de fixer le GTP et le GDP et ayant une activité GTPase.

5 L'un des autres aspects de l'invention est de proposer de nouveaux acides nucléiques codant pour des séquences d'acides aminés présentant des propriétés biologiques intéressantes.

10 L'un des autres aspects de l'invention est de proposer des moyens de dépistage, in vitro, de certaines pathologies liées soit à des teneurs en protéines situées en dehors du domaine des valeurs qu'elles ont généralement chez un individu sain, soit à des mutations dans ces protéines.

15 L'invention a pour objet de nouvelles séquences d'acides aminés caractérisée en ce qu'elle contiennent l'un au moins des enchaînements d'acides aminés suivants :

MREYKLVVL (I)

20 ALTVOFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEIL (II)

QFTAMRDLYMKNQGQFALVYSITAQSTFNDLQDLREQILRVKDTEDVPM
(III)

EDERVVGKEQGQNLARQWCNCAFL (IV)

25 SKINVNEIFYDLVRQINRKTTPVEKKKPKKKSCLLL (V)

ALTVOFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEIL (VII)

QFTAMRDLYMKNQGQFALVYSITAQSTFNDLQDLREQILRVKDTDDVPMI
(VIII).

30 EDERVVGKEQGQNLARQWNNCAFL (IX)

SKINVNEIFYDLVRQINRKTTPVPGKARKKSSCQLL (X)

35 MREYKVVVL (XI)

ALTVQFVTGTFIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSPSVLEIL (XII)

QFASMRDLYIKNGQGFIQSLVSLVNQQSFQDIKPMRDQIIRVKRYEKVPVI (XIII)

5 ESEREVSSSEGRALAEWGPCFM (XIV)

SKTMVDELFAEIVRQMNYAAQPDKDDPCCSACNIQ (XV)

10 Dans ce qui précède et ce qui suit, les acides aminés sont représentés par une lettre unique, conformément à la nomenclature classiquement utilisée dans ce domaine.

15 Les séquences d'acides aminés sont écrites de telle façon que l'extrémité la plus à gauche correspond à l'extrémité N-terminale du premier amino acide délimitant les susdites séquences et l'extrémité la plus à droite correspond à l'extrémité C-terminale du dernier amino acide délimitant les susdites séquences.

20 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les séquences d'acides aminés de l'invention contiennent au moins l'un des enchaînements (I), (II), (III), (IV) ou (V) définis ci-dessus.

25 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les séquences d'acides aminés de l'invention contiennent au moins l'un des enchaînements (VII), (VIII), (IX) ou (X) définis ci-dessus.

30 Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les séquences d'acides aminés de l'invention contiennent au moins l'un des enchaînements (XI), (XII), (XIII), (XIV) ou (XV) définis ci-dessus.

35

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les séquences d'acides aminés de l'invention comportent une threonine en position 61.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les séquences d'acides aminés de l'invention sont telles que le quatrième amino acide à partir du dernier amino acide C-terminal est une cystéine.

10 Selon un autre mode de réalisation selon l'invention, les séquences d'acides aminés contiennent les 5 enchaînements (I), (II), (III), (IV) et (V) définis ci-dessus.

15 Lorsque les séquences d'acides aminés selon l'invention comportent les 5 enchaînements indiqués ci-dessus, ceux-ci sont avantageusement situés, de gauche à droite, dans l'ordre (I)-(II)-(III)-(IV)-(V), ces enchaînements étant en outre avantageusement non contigus.

20 Selon un autre mode de réalisation selon l'invention, les séquences d'acides aminés contiennent les 5 enchaînements (VII), (VIII), (IX) et (X) définis ci-dessus.

25 Lorsque les séquences d'acides aminés selon l'invention comportent les 5 enchaînements indiqués ci-dessus, ceux-ci sont avantageusement situés, de gauche à droite, dans l'ordre (VII)-(VIII)-(IX)-(X), ces enchaînements étant en outre avantageusement non contigus.

30 Selon un autre mode de réalisation selon l'invention, les séquences d'acides aminés contiennent les 5 enchaînements (XI), (XII), (XIII), (XIV) et (XV) définis ci-dessus.

35 Lorsque les séquences d'acides aminés selon l'invention comportent les 5 enchaînements indiqués

ci-dessus, ceux-ci sont avantageusement situés, de gauche à droite, dans l'ordre (XI)-(XII)-(XIII)-(XIV)-(X), ces enchaînements étant en outre avantageusement non contigus.

5

Des séquences d'acides aminés selon l'invention particulièrement avantageuses contiennent l'enchaînement d'acides aminés XVI, représenté sur la figure 1.

10

Des séquences d'acides aminés selon l'invention particulièrement avantageuses sont constituées par l'enchaînement d'acides aminés XVI, représenté sur la figure 1.

15

Des séquences d'acides aminés selon l'invention particulièrement avantageuses contiennent l'enchaînement d'acides aminés XVII, représenté sur la figure 2.

20

Des séquences d'acides aminés selon l'invention particulièrement avantageuses sont constituées par l'enchaînement d'acides aminés XVII, représenté sur la figure 2.

25

Des séquences d'acides aminés selon l'invention particulièrement avantageuses contiennent l'enchaînement d'acides aminés XVIII, représenté sur la figure 3.

30

Des séquences d'acides aminés selon l'invention particulièrement avantageuses sont constituées par l'enchaînement d'acides aminés XVIII, représenté sur la figure 3.

Les séquences d'acides aminés XVI, XVII et XVIII seront également respectivement désignées par RAP1A, RAP1B et RAP2 dans la suite du texte.

35

Ces séquences d'acides aminés présentent une threonine en position 61 et une cystéine 4 acides aminés à partir du dernier amino acide C-terminal.

A cet égard, pour les séquences d'acides aminés représentées respectivement sur la figure 1, 2 et 3, la position d'un acide aminé déterminé est repérée par rapport au premier acide aminé de la séquence
5 alors que pour les séquences nucléotidiques (figurant également sur les figures 1, 2 et 3) la position d'un nucléotide déterminé est repérée par rapport au premier nucléotide.

Ces séquences d'acides aminés présentent
10 d'intéressantes propriétés biochimiques et biologiques : elles ont la capacité de fixer le GTP et le GDP et présentent une activité GTPase.

Elles sont par ailleurs non transformantes, c'est-à-dire notamment ne modifient pas les
15 propriétés morphologiques et cinétiques de la cellule et n'altèrent pas la propriété d'inhibition de contact des cellules.

Ceci étant, leur absence, leur surexpression (c'est-à-dire leur expression en des quantités
20 supérieures à celles généralement contenues chez un individu sain), ainsi que certaines de leurs mutations peuvent correspondre à un état pathologique.

Ces séquences d'acides aminés sont également
25 susceptibles de se lier à la membrane intracellulaire.

Les séquences d'acides aminés précédentes peuvent être modifiées dès lors qu'elles conservent les propriétés biochimiques et biologiques des
30 séquences d'acides aminés (XVI), (XVII) et (XVIII) définies précédemment.

Par exemple, et de façon non limitative, des séquences d'acides aminés entrant dans le cadre de

l'invention peuvent se distinguer des séquences d'acides aminés définies ci-dessus :

- par addition et/ou
 - 5 - suppression d'un ou de plusieurs acides aminés et/ou
 - modification d'un ou de plusieurs acides aminés,
- sous réserve que les propriétés biochimiques et biologiques comme indiqué ci-dessus soient
- 10 conservées.

Entrent également dans le cadre de l'invention les séquences d'acides aminés (XVI), (XVII) et (XVIII) présentant des mutations en position 12 (c'est-à-dire remplacement de la glutamine en 12 par

15 n'importe quel autre acide aminé).

Entrent également dans le cadre de l'invention les séquences d'acides aminés (XVI), (XVII) et (XVIII) présentant des mutations en position 61 (c'est-à-dire remplacement de la threonine en 61 par

20 n'importe quel autre acide aminé et notamment par la glutamine et la valine).

L'invention vise également les séquences d'acides aminés contenant l'un au moins des enchaînements d'acides aminés codés par les

25 enchaînements nucléotidiques suivants :

ATG CGT GAG TAC AAG CTA GTG GTC CTT (1)
GCT CTG ACA GTT CAG TTT GTT CAG GGA ATT TTT GTT GAA
AAA TAT GAC CCA ACG ATA GAA GAT TCC TAC AGA AAG CAA
30 GTT GAA GTC GAT TGC CAA CAG TGT ATG CTC GAA ATC CTG
 (2)

CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTG TAT ATG AAG AAC GGC
CAA GGT TTT GCA CTA GTA TAT TCT ATT ACA GCT CAG TCC
ACG TTT AAC GAC TTA CAG GAC CTG AGG GAA CAG ATT TTA
5 CGG GTT AAG GAC ACG GAA GAT GTT CCA ATG ATT
(3)

GAA GAT GAG CGA GTA GTT GGC AAA GAG CAG GGC CAG AAT
TTA GCA AGA CAG TGG TGT AAC TGT GCC TTT TTA (4)

10 TCA AAG ATC AAT GTT AAT GAG ATA TTT TAT GAC CTG GTC
AGA CAG ATA AAT AGG AAA ACA CCA GTG GAA AAG AAG AAG
CCT AAA AAG AAA TCA TGT CTG CTG CTC
(5)

15 ATG CGT GAG TAT AAG CTA GTC GTT CTT (6)

GCT TTG ACT GTA CAA TTT GTT CAA GGA ATT TTT GTA GAA
AAA TAC GAT CCT ACG ATA GAA GAT TCT TAT AGA AAG CAA
GTT GAA GTA GAT GCA CAA CAG TGT ATG CTT GAA ATC TTG
20 (7)

CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTA TAC ATG AAA AAT GGA
CAA GGA TTT GCA TTA GTT TAT TCC ATC ACA GCA CAG TCC
ACA TTT AAC GAT TTA CAA GAC CTG AGA GAA CAG ATT CTT
25 CGA GTT AAA GAC ACT GAT GAT GTT CCA ATG ATT
(8)

GAA GAT GAA AGA GTT GTA GGG AAG GAA CAA GGT CAA AAT
CTA GCA AGA CAA TGG AAC AAC TGT GCA TTC TTA (9)

30 TCA AAA ATA AAT GTT AAT GAG ATC TTT TAT GAC CTA GTG
CGG CAA ATT AAC AGA AAA ACT CCA GTG CCT GGG AAG GCT
CGC AAA AAG TCA TCA TGT CAG CTG CTT
(10)

35 ATG CGC GAG TAC AAA GTG GTG GTG CTG (11)

GCC CTG ACC GTG CAG TTC GTG ACC GGC ACC TTC ATC GAG
AAA TAC GAC CCC ACC ATC GAG GAC TTC TAC CGC AAG GAG
ATC GAG GTG GAT TCG TCG CCG TCG GTG CTG GAG ATC CTG
(12)

5

CAG TTC GCG TCC ATG CGG GAC CTG TAC ATC AAG AAC GGC
CAG GGC TTC ATC CTC GTC TAC AGC CTC GTC AAC CAG CAG
AGC TTC CAG GAC ATC AAG CCC ATG CGG GAC CAG ATC ATC
CGC GTG AAG CGG TAT GAG AAA GTG CCA GTC ATC
(13)

10

GAA AGT GAG AGA GAA GTA TCG TCC AGC GAA GGC AGA GCC
CTT GCT GAA GAG TGG GGC TGC CCC TTT ATG (14)

15

AGT AAA ACA ATG GTG GAC GAA CTC TTT GCA GAA ATT GTG
AGG CAG ATG AAC TAT GCT GCT CAG CCT GAC AAA GAT GAC
CCA TGC TGT TCT GCA TGT AAC ATA CAA
(15)

20

Entrent également dans le cadre de l'invention
les acides nucléiques contenant l'un au moins des
enchaînements de nucléotides codant pour les
séquences d'acides aminés définies précédemment.

25

Selon un mode de réalisation avantageux de
l'invention, les acides nucléiques appartiennent au
génomme humain.

30

Selon un mode de réalisation avantageux, les
acides nucléiques de l'invention codent pour les
enchaînements d'acides aminés I à XVIII définis ci-
dessus.

35

Selon encore un autre mode de réalisation
avantageux, les séquences d'acides nucléiques de
l'invention codent pour les séquences d'acides
aminés contenant les enchaînements XVI, XVII et
XVIII définis ci-dessus.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les séquences d'acides nucléiques de l'invention codent pour les enchaînements d'acides aminés XVI, XVII et XVIII définis ci-dessus.

5 Des acides nucléiques avantageux de l'invention sont ceux contenant l'un au moins des enchaînements de nucléotides suivants:

ATG CGT GAG TAC AAG CTA GTG GTC CTT (1)

10 GCT CTG ACA GTT CAG TTT GTT CAG GGA ATT TTT GTT GAA
AAA TAT GAC CCA ACG ATA GAA GAT TCC TAC AGA AAG CAA
GTT GAA GTC GAT TGC CAA CAG TGT ATG CTC GAA ATC CTG
(2)

15 CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTG TAT ATG AAG AAC GGC
CAA GGT TTT GCA CTA GTA TAT TCT ATT ACA GCT CAG TCC
ACG TTT AAC GAC TTA CAG GAC CTG AGG GAA CAG ATT TTA
CGG GTT AAG GAC ACG GAA GAT GTT CCA ATG ATT
(3)

20 GAA GAT GAG CGA GTA GTT GGC AAA GAG CAG GGC CAG AAT
TTA GCA AGA CAG TGG TGT AAC TGT GCC TTT TTA (4)

25 TCA AAG ATC AAT GTT AAT GAG ATA TTT TAT GAC CTG GTC
AGA CAG ATA AAT AGG AAA ACA CCA GTG GAA AAG AAG AAG
CCT AAA AAG AAA TCA TGT CTG CTG CTC
(5)

ATG CGT GAG TAT AAG CTA GTC GTT CTT (6)

30 GCT TTG ACT GTA CAA TTT GTT CAA GGA ATT TTT GTA GAA
AAA TAC GAT CCT ACG ATA GAA GAT TCT TAT AGA AAG CAA
GTT GAA GTA GAT GCA CAA CAG TGT ATG CTT GAA ATC TTG
(7)

35

CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTA TAC ATG AAA AAT GGA
CAA GGA TTT GCA TTA GTT TAT TCC ATC ACA GCA CAG TCC
ACA TTT AAC GAT TTA CAA GAC CTG AGA GAA CAG ATT CTT
5 CGA GTT AAA GAC ACT GAT GAT GTT CCA ATG ATT
(8)

GAA GAT GAA AGA GTT GTA GGG AAG GAA CAA GGT CAA AAT
CTA GCA AGA CAA TGG AAC AAC TGT GCA TTC TTA (9)
10 TCA AAA ATA AAT GTT AAT GAG ATC TTT TAT GAC CTA GTG
CGG CAA ATT AAC AGA AAA ACT CCA GTG CCT GGG AAG GCT
CGC AAA AAG TCA TCA TGT CAG CTG CTT
(10)

15 ATG CGC GAG TAC AAA GTG GTG GTG CTG (11)
GCC CTG ACC GTG CAG TTC GTG ACC GGC ACC TTC ATC GAG
AAA TAC GAC CCC ACC ATC GAG GAC TTC TAC CGC AAG GAG
ATC GAG GTG GAT TCG TCG CCG TCG GTG CTG GAG ATC CTG
(12)

20 CAG TTC GCG TCC ATG CGG GAC CTG TAC ATC AAG AAC GGC
CAG GGC TTC ATC CTC GTC TAC AGC CTC GTC AAC CAG CAG
AGC TTC CAG GAC ATC AAG CCC ATG CGG GAC CAG ATC ATC
CGC GTG AAG CGG TAT GAG AAA GTG CCA GTC ATC
25 (13)

GAA AGT GAG AGA GAA GTA TCG TCC AGC GAA GGC AGA GCC
CTT GCT GAA GAG TGG GGC TGC CCC TTT ATG (14)

30 AGT AAA ACA ATG GTG GAC GAA CTC TTT GCA GAA ATT GTG
AGG CAG ATG AAC TAT GCT GCT CAG CCT GAC AAA GAT GAC
CCA TGC TGT TCT GCA TGT AAC ATA CAA
(15)

35 Selon un autre mode de réalisation avantageux,
les acides nucléiques de l'invention contiennent les

cinq enchaînements de nucléotides (1), (2), (3), (4) et (5), définis ci-dessus.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux, les acides nucléiques de l'invention contiennent les cinq enchaînements de nucléotides (6), (7), (8), (9) et (10), définis ci-dessus.

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux, les acides nucléiques de l'invention contiennent les cinq enchaînements de nucléotides (11), (12), (13), (14) et (15), définis ci-dessus.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux, les acides nucléiques de l'invention contiennent l'enchaînement de nucléotides (16), délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 43 et 594 de la figure 1.

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux, les acides nucléiques de l'invention sont constitués par l'enchaînement de nucléotides (16), délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 43 et 594 de la figure 1.

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux, les acides nucléiques de l'invention contiennent l'enchaînement de nucléotides (19) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 605 de la figure 1.

30 Selon un autre mode de réalisation avantageux, les acides nucléiques de l'invention sont constitués par l'enchaînement de nucléotides (19) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 605 de la figure 1.

35

Selon encore un autre mode de réalisation, les acides nucléiques de l'invention contiennent l'enchaînement de nucléotides (17), délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 54 et 605 de la figure 2.

Selon encore un autre mode de réalisation, les acides nucléiques de l'invention sont constitués par l'enchaînement de nucléotides (17), délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 54 et 605 de la figure 2.

Selon encore un autre mode de réalisation, les acides nucléiques de l'invention contiennent l'enchaînement de nucléotides (20) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 838 de la figure 2.

Selon encore un autre mode de réalisation, les acides nucléiques de l'invention sont constitués par l'enchaînement de nucléotides (20) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 838 de la figure 2.

Selon encore un autre mode de réalisation, les acides nucléiques de l'invention contiennent l'enchaînement de nucléotides (18), délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 4 et 552 de la figure 3.

Selon encore un autre mode de réalisation, les acides nucléiques de l'invention sont constitués par l'enchaînement de nucléotides (18), délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux

nucléotides situés aux positions 4 et 552 de la figure 3.

5 Selon encore un autre mode de réalisation, les acides nucléiques de l'invention contiennent l'enchaînement de nucléotides (21) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 558 de la figure 3.

10 Selon encore un autre mode de réalisation, les acides nucléiques de l'invention sont constitués par l'enchaînement de nucléotides (21) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 558 de la figure 3.

15 Les acides nucléiques (16), (17), (18), (19), (20) et (21) de l'invention présentent tous la particularité d'hybrider avec le gène Dras-3 de la drosophile tel que représenté sur la figure 5, dans les conditions faiblement stringentes définies ci-après :

20 hybridation à 60°C dans 5X SSC, 5X Denhardt, 0,1 % SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon, dernier lavage dans 2X SSC et 0,1 % de SDS, à 60°C pendant environ 15 mn.

25 Les acides nucléiques (16), (17), (18), (19), (20) et (21) peuvent être modifiés dès lors que les séquences d'acides aminés qu'ils codent conservent leurs propriétés biochimiques et biologiques.

30 De telles modifications non limitatives conduisent par exemple à des acides nucléiques variants qui se distinguent des acides nucléiques ci-dessus :

- par addition et/ou

35

- suppression d'un ou de plusieurs nucléotides
et/ou

- modification d'un ou de plusieurs
nucléotides,

5 sous réserve que l'enchaînement ainsi formé soit
capable d'hybrider avec la même séquence d'ARN ou
d'ADN que l'enchaînement correspondant non modifié,
et que les séquences d'acides aminés, codées par ces
10 acides nucléiques, conservent les propriétés
biochimiques et biologiques indiquées ci-dessus.

Les acides nucléiques (16) et (19) peuvent
également être caractérisés par la carte de
restriction qui fait l'objet de la figure 7.

15 Les acides nucléiques (17) et (20) peuvent
également être caractérisés par la carte de
restriction qui fait l'objet de la figure 8.

Les acides nucléiques (18) et (21) peuvent
également être caractérisés par la carte de
20 restriction qui fait l'objet de la figure 9.

Ces cartes de restriction ne sauraient être
interprétées comme ayant un caractère limitatif pour
identifier les acides nucléiques comportant
respectivement l'enchaînement indiqué précédemment.

25 Des acides nucléiques équivalents pourraient
également être définis par une carte de restriction
ayant une communauté avec les cartes de restriction
définies précédemment d'au moins 50 % des sites de
restriction, situés dans le même ordre.

30 L'invention vise également les sondes utilisées
pour caractériser les acides nucléiques décrits
précédemment.

Ces sondes sont définies par leur capacité à
s'hybrider avec les susdits acides nucléiques ou

leurs séquences complémentaires dans les conditions d'hybridation suivantes :

5 - pour les sondes susceptibles de s'hybrider avec les acides nucléiques (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10), (12), (13), (14) et (15) ou leurs séquences complémentaires les conditions d'hybridation sont les suivantes :

10 hybridation proprement dite : 60°C, 5X SSC, 5X Denhardt, 0,1% SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon ; lavage : 60°C, 2X SSC, 0,1% SDS, 30 mn ;

15 - pour les sondes susceptibles de s'hybrider avec les acides nucléiques ou les séquences complémentaires (1), (6) et (11) les conditions d'hybridation sont les suivantes :

hybridation proprement dite : 45°C, 5X SSC, 5X Denhardt, 0,1% SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon ;

20 1° lavage : température ambiante, 2X SSC, 0,1% SDS, 30mn,

2° lavage : 45°C, 2X SSC, 0,1% SDS, 30mn.

25 Comme sonde oligonucléotidique pour identifier les séquences d'acides nucléiques de l'invention, on peut par exemple utiliser la sonde constituée par la séquence oligonucléotidique suivante :

GAA ATC CTG GAT ACT GCA GGG ACA GAG CAA TTT

ou la séquence complémentaire correspondante.

30 Pour identifier les acides nucléiques (16) et (19) de l'invention, on peut, par exemple, utiliser comme sonde la séquence d'oligonucléotides délimitée par les nucléotides correspondant aux nucléotides situés aux positions 493 et 605 de la figure 1, ou la séquence complémentaire correspondante.

35 Pour identifier les acides nucléiques (17) et (20) de l'invention, on peut, par exemple, utiliser

comme sonde la séquence d'oligonucléotides délimitée par les nucléotides correspondant aux nucléotides situés aux positions 504 et 838 de la figure 2, ou la séquence complémentaire correspondante.

5

Pour identifier les acides nucléiques (18) et (21) de l'invention, on peut, par exemple, utiliser comme sonde la séquence d'oligonucléotides délimitée par les nucléotides correspondant aux nucléotides situés aux positions 451 et 558 de la figure 3, ou la séquence complémentaire correspondante.

10

L'invention se rapporte également à un acide nucléique recombinant caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique tel que décrit plus haut, inséré dans un acide nucléique hétérologue vis-à-vis du susdit fragment.

15

L'acide nucléique hétérologue ci-dessus peut consister en un acide nucléique ou un fragment d'acide nucléique appartenant à une bactérie ou encore à une cellule eucaryote, ladite bactérie ou ladite cellule eucaryote étant choisie en tant que système d'expression d'un des fragments d'ADN décrit précédemment.

20

Un autre acide nucléique hétérologue convenable pour la réalisation de l'invention peut également consister en un plasmide ou un phage.

25

L'invention concerne en outre un vecteur recombinant, en particulier pour le clonage et/ou l'expression d'un acide nucléique selon l'invention, ledit vecteur étant notamment du type plasmide ou phage, caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique recombinant comme défini ci-dessus, contenant le susdit acide nucléique en l'un des sites non essentiels pour sa réplication.

30

35

Ce vecteur recombinant peut ainsi être formé par l'ADN hétérologue précédent dans la mesure où celui-ci constitue un système autonome de réplication.

5 Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le vecteur recombinant ci-dessus est un vecteur d'expression contenant en l'un de ses sites non essentiels pour sa réplication, des éléments nécessaires pour promouvoir l'expression, dans un
10 hôte cellulaire, d'un acide nucléique codant pour une séquence d'acides aminés de l'invention, un promoteur compatible avec ledit hôte cellulaire, en particulier un promoteur inductible, et éventuellement une séquence signal et/ou une
15 séquence d'ancrage.

Le choix du promoteur, de la séquence signal et de la séquence d'ancrage est déterminé en fonction de la nature du système d'expression choisi. Un vecteur recombinant particulier approprié à
20 l'expression des séquences d'acides aminés selon l'invention dans E. Coli, qui comprend, en un site non essentiel pour sa réplication :

- les éléments permettant son insertion dans E.Coli,
- 25 - les éléments permettant l'expression de l'acide nucléique inséré dans le vecteur par E.Coli,
- et éventuellement les éléments permettant l'exportation du produit résultant de l'expression du susdit acide nucléique.

30 Un autre vecteur recombinant est caractérisé en ce qu'il contient les éléments permettant d'insérer un acide nucléique, décrit plus haut, dans une levure et l'expression de cet acide nucléique dans
35 cette levure.

D'autres cellules eucaryotes pourront être choisies pour insérer le vecteur recombinant contenant l'acide nucléique de l'invention, ce choix étant orienté par la capacité de ladite cellule eucaryote à organiser l'expression dudit acide nucléique.

L'invention se rapporte encore aux hôtes cellulaires transformés par un vecteur recombinant tels que ceux décrits plus haut, lequel vecteur est capable de se répliquer dans ledit microorganisme.

Un premier hôte cellulaire préféré est constitué par E.coli transformé par un vecteur recombinant tel que décrit précédemment.

Un autre hôte cellulaire préféré est une levure transformée par un vecteur recombinant. La levure généralement utilisée est *Saccharomyces Cerevisiae*.

D'autres hôtes cellulaires peuvent encore être mis en oeuvre.

L'invention vise naturellement le produit d'expression de chacun des microorganismes transformés par l'un des vecteurs recombinants décrits dans les pages précédentes.

L'invention vise également un procédé de préparation des nouveaux peptides sus-mentionnés par synthèse qui comprend soit l'addition étape par étape des résidus peptidiques choisis, avec l'addition ou l'élimination de groupes protecteurs quelconques des fonctions amino et carboxyles, ou addition de résidus peptidiques choisis afin de produire des fragments suivis d'une condensation desdits fragments en une séquence en acides aminés appropriée, avec addition ou élimination des groupes protecteurs choisis.

L'invention vise également un procédé de préparation d'une séquence d'acides aminés conforme à la description ci-dessus, caractérisé en ce que :

5 - on cultive, dans un milieu de culture approprié, un hôte cellulaire préalablement transformé par un vecteur approprié contenant un acide nucléique précédemment défini,

10 - on récupère à partir du susdit milieu de culture la séquence d'acides aminés produite par ledit microorganisme transformé, après lyse de la membrane cellulaire de ce dernier.

15 Le procédé de préparation d'une séquence d'acides aminés déterminée peut être en particulier caractérisé par la mise en culture de E.coli transformée par un vecteur recombinant décrit plus haut et par l'arrêt de la culture en fin de phase exponentielle de croissance dudit E.coli, et récupération de la séquence d'acides aminés déterminée à partir du milieu de culture exempt des
20 autres protéines et enzymes exocellulaires susceptibles d'être secrétées par E.coli.

25 Le procédé de préparation d'une séquence d'acides aminés déterminée peut encore être appliqué à une levure transformée par un vecteur recombinant tel que décrit plus haut cette levure étant placée en culture dans un milieu approprié et ladite culture étant arrêtée en fin de phase exponentielle de croissance de la levure utilisée.

30 L'invention se rapporte également à des anticorps dirigés contre les séquences d'acides aminés ci-dessus. En particulier, l'invention vise des anticorps monoclonaux.

De tels anticorps monoclonaux peuvent être produits par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

5 Dans un premier temps, on inocule une des séquences d'acides aminés ci-dessus à un animal choisi, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre cette séquence en acides aminés. ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules
10 myélomateuses "immortelles" pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène de cellules ainsi obtenu, on réalise alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier
15 indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis des séquences d'acides aminés de l'invention pourront être testées par
20 exemple sur colonne d'affinité.

L'invention concerne également une méthode de dépistage in vitro des séquences d'acides aminés sus-mentionnées, à partir d'un prélèvement biologique susceptible de les contenir. Une telle
25 méthode de dépistage selon l'invention, peut être réalisée soit à l'aide des anticorps monoclonaux sus-mentionnés, soit à l'aide des sondes oligonucléotidiques décrites ci-dessus.

30 Le prélèvement biologique sus-mentionné est effectué soit dans des tissus fluides, tels que le sang, soit dans des organes, ce dernier type de prélèvement permettant notamment d'obtenir des coupes fines de tissus sur lesquelles les anticorps
35 sus-mentionnés sont ultérieurement fixés.

La méthode de dépistage selon l'invention, procédant par l'intermédiaire des anticorps sus-mentionnés comprend notamment les étapes suivantes:

- 5 - la mise en contact d'au moins un des anticorps reconnaissant spécifiquement une séquence d'acides aminés de l'invention, avec le susdit prélèvement biologique ;
- 10 - la détection à l'aide de tout moyen approprié des éventuels complexes immunologiques formés entre les séquences d'acides aminés et les anticorps sus-mentionnées.

Avantageusement, les anticorps utilisés pour la mise en oeuvre d'un tel procédé sont marqués notamment de manière enzymatique ou radio-active.

- 15 Une telle méthode selon l'invention peut notamment être réalisée suivant la méthode ELISA (enzyme linked sorbent assay) qui comprend les étapes suivantes :

- 20 - fixation d'une quantité prédéterminée d'anticorps marqués à l'aide d'un marqueur enzymatique sur un support solide, tel qu'un puits d'une microplaque ;
- addition du prélèvement biologique (sous forme liquide) sur ledit support ;
- 25 - incubation pendant un temps suffisant pour permettre la réaction immunologique entre lesdits anticorps et les séquences en acides aminés sus-mentionnées ;
- addition d'un substrat spécifique de l'activité enzymatique libérée lors de la réaction
- 30 immunologique précédente;
- détection, à l'aide de tout moyen approprié, de la dégradation du substrat par l'enzyme ; et
- corrélation de la quantité d'enzymes libérées à la
- 35 quantité de séquences d'acides aminés présentes.

Selon un autre mode de réalisation de la méthode de dépistage de l'invention, les anticorps sus-mentionnés ne sont pas marqués et la détection des complexes immunologiques formés entre les séquences en acides aminés et lesdits anticorps est réalisée à l'aide d'une immunoglobuline marquée reconnaissant lesdits complexes.

la méthode de dépistage selon l'invention peut également être réalisée par une technique immuno-enzymatique suivant un mécanisme de compétition entre les séquences d'acides aminés susceptibles d'être contenues dans le prélèvement biologique, et des quantités prédéterminées de ces mêmes séquences d'acides aminés, vis-à-vis des anticorps sus-mentionnés. Dans ce dernier cas, les séquences d'acides aminés de l'invention en quantité prédéterminée sont avantageusement marquées à l'aide d'un marqueur enzymatique.

L'invention ne se limite nullement aux modes de réalisation décrits ci-dessus pour le dépistage in vitro des séquences d'acides aminés de l'invention, ce dépistage pouvant être réalisé à l'aide de toute autre méthode immunologique, notamment immunoenzymatique actuellement connue.

L'invention concerne également une méthode de dépistage in vitro des séquences d'acides aminés de l'invention réalisée à partir d'un prélèvement biologique susceptible de contenir des acides nucléiques codant pour lesdites séquences d'acides aminés, caractérisée en ce qu'elle comprend:

- la mise en contact d'au moins une des sondes oligonucléotidiques décrites ci-dessus avec le susdit prélèvement biologique ;

- la détection à l'aide de tout moyen approprié des éventuels complexes d'hybridation formés entre les sondes et les acides nucléiques sus-mentionnés.

5 Le prélèvement biologique sus-mentionné est, préalablement à la mise en oeuvre du dépistage, traité de manière à ce que les cellules qu'il contient soient lysées, et en ce que le matériel génomique contenu dans lesdites cellules soit
10 fragmenté à l'aide d'enzymes de restriction du type EcoRI, BamHI etc.

Avantageusement, les sondes oligonucléotidiques sont marquées à l'aide d'un marqueur enzymatique ou radio-actif. Ces sondes sont placées sur un support approprié, notamment sur un filtre de nitrocellulose
15 ou autre, par exemple nylon, sur lequel est ensuite additionné le prélèvement biologique traité comme il l'a été indiqué ci-dessus.

L'invention a également pour objet une méthode de diagnostic in vitro de maladies corrélées à des teneurs en séquences d'acides aminés de l'invention
20 situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes correspondant généralement à l'état physiologique d'un individu sain, par mise en oeuvre d'une des méthodes de dépistage in vitro sus-
25 mentionnées.

La présence de faibles quantités, voire l'absence totale, des séquences d'acides aminés de l'invention dans les prélèvements biologiques testés, ou au contraire la surexpression desdites
30 séquences dans les cellules du prélèvement, témoigne d'un déséquilibre probable entre les facteurs anti-oncogéniques et oncogéniques de ces cellules, et ce en faveur de ces derniers, risquant de déclencher
35 une pathologie cancéreuse, notamment par perte

d'inhibition de contact entre les cellules du tissu ou de l'organe à partir duquel le prélèvement a été effectué.

5 L'invention a également pour objet des nécessaires ou kits pour la mise en oeuvre des méthodes de dépistage in vitro sus-mentionnées.

A titre d'exemple, de tels kits comprennent notamment :

- 10 - une quantité déterminée d'au moins un des anticorps monoclonaux sus-mentionnés susceptibles de donner lieu à une réaction immunologique spécifique avec une des séquences d'acides aminés de l'invention ;
- 15 - avantageusement, un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre les séquences d'acides aminés et les anticorps sus-mentionnés,
- 20 - avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques produits lors de la réaction immunologique sus-mentionnée.

Dans le cadre de la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro utilisant des sondes oligonucléotidiques, les kits utilisés comprennent par exemple :

- 25 - une quantité déterminée d'au moins une des sondes oligonucléotidiques sus-mentionnées susceptibles de donner lieu à une réaction d'hybridation avec un des acides nucléiques sus-mentionnés codant pour les séquences d'acides aminés de l'invention,
- 30 - avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre les acides nucléiques et les sondes sus-mentionnées ;

- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation produits lors de la réaction d'hybridation sus-mentionnée.

5 Les séquences d'acides aminés selon l'invention présentent d'intéressantes propriétés revertantes.

Pour mettre en évidence ces propriétés, on procède de la façon suivante :

10 - on insère une des séquences nucléotidiques RAP1A, RAP1B ou RAP2 normale et mutée dans un vecteur d'expression eucaryote avec un promoteur fort tel que LTR,

15 - on effectue des transfections à l'aide du susdit vecteur sur des cellules qui ont été préalablement transformées par le gène RAS,

- on co-transfecte ces cellules avec le gène RAP1A ou RAP1B ou RAP2 et un gène de résistance à un antibiotique, par exemple la néomycine, comme marqueur de sélection,

20 - on fait exprimer RAP1A ou RAP1B ou RAP2 dans ces cellules et on peut observer une réversion phénotypique,

25 - on isole les cellules qui ont un phénotype normal revertant, on les analyse et on constate l'expression du gène RAP1A ou RAP1B ou RAP2 (d'une part en ARN et d'autre part en protéines) directement responsables de la réversion.

30 Plus précisément, afin d'aborder l'étude fonctionnelle des protéines produits des gènes RAP1A et RAP2, ont été développés deux types d'outils, anticorps et lignées cellulaires surproductrices;

35 - les cDNAs correspondant aux gènes RAP1A et RAP2 ont été insérés dans des vecteurs d'expression eucaryotes et transférés par transfection dans différentes lignées cellulaires, par exemple des

cellules fibroblastiques en culture d'origine murine NIH3T3 dans le cas de RAP1A et RAT1 dans le cas de RAP2. L'ADNc du gène RAP2 ne semble conférer aucun phénotype particulier lorsqu'il est exprimé dans des fibroblastes normaux. Par contre, sa surexpression dans des lignées transformées par les oncogènes H-ras et Ki-ras est corrélée à une réversion phénotypique de ces cellules vers un phénotype non transformé;

- des anticorps polyclonaux de lapin ont été générés contre les protéines RAP1A et RAP2 ou des peptides dérivés de leur séquence. Les anticorps obtenus reconnaissent de façon spécifique la protéines RAP1A ou RAP2 et ne présentent pas de réaction croisée avec la protéine H-ras;

- l'utilisation de ces anticorps pour immunoprécipiter la protéine RAP2 dans les lignées cellulaires la surexprimant a permis de montrer que c'est une protéine membranaire. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui est rapidement modifié pour donner naissance à la forme mature de la protéine; celle-ci est relativement stable in vivo avec un temps de demi-vie métabolique de l'ordre de 12-24 h.

Les séquences d'acides aminés de l'invention présentant les propriétés de réversion indiquées ci-dessus sont susceptibles d'être utilisées pour le traitement thérapeutique de maladies liées aux gènes RAS ou de maladies dans lesquelles le gène RAP pourrait être mis en cause, soit par mutation, soit par mauvaise expression dans certaines cellules.

Pour ce faire, on introduit le gène qui code pour l'une des séquences d'acides aminés de l'invention dans un vecteur d'expression, lequel

doit être compatible avec les cellules vers lesquelles on veut les diriger et dont les promoteurs doivent être également compatibles avec lesdites cellules.

5 On cible ensuite le vecteur pour qu'il aille se fixer dans les cellules visées, afin que celles-ci le phagocytent et qu'il soit libéré et exprimé dans lesdites cellules.

10 EXEMPLE 1: CLONAGE ET SEQUENCAGE DES ACIDES NUCLEIQUES RAP1A ET RAP2:

1) Isolement des clones humains d'ADNc homologues au gène Dras-3 de la drosophile :

15 On utilise une banque d'ADNc construite dans le phage λ gt10 à partir d'ARNm de cellules de lymphocytes B humains (lignée Raji) et criblée sous des conditions d'hybridation faiblement stringentes (définies ci-après dans le paragraphe intitulé "Matériels et méthodes") avec l'insert complet d'ADN Dras-3 de la drosophile.

20 On isole 15 phages à partir de 100 000 phages recombinants. Les inserts EcoRI sont purifiés, soumis à des réactions d'hybridation croisée les uns vis-à-vis des autres sous des conditions fortement stringentes (définies ci-après dans la paragraphe intitulé "Matériels et méthodes") et sont partiellement séquencés. On peut ainsi identifier
25 deux catégories de clones, 14 dérivant d'un même gène et un quinzième dérivant d'un autre gène voisin.

30 On désigne par RAP1A le clone de la première famille et par RAP2 l'unique clone de la seconde famille.

35 De l'ADN génomique humain originaire de placenta a été hydrolysé par les enzymes de

restriction suivantes BamHI, EcoRI et HindIII, et les colonnes A,B,C,D,E et F correspondent respectivement à :

- 5 colonne A : BamHI
- colonne B : BamHI + EcoRI
- colonne C : BamHI + HindIII
- colonne D : HindIII
- colonne E : HindIII + EcoRI
- 10 colonne F : EcoRI

puis hybridé avec les inserts EcoRI respectivement de l'ADNc des clones RAP1A et RAP2.

La figure 4 montre le profil d'hybridation des gènes cellulaires RAP1A (1) et RAP2 (2).

15 La taille des fragments déterminés par le marqueur d'HindIII est porté à gauche en kilo paires de base.

2) Séquence nucléotidique des ADNc de RAP1A et RAP2:

20 On détermine la séquence nucléotidique des inserts de 1 450 paires de base et 980 paires de base des ADNc respectivement de RAP1A et RAP2.

Les séquences d'acides aminés codées par ces clones sont respectivement représentées sur les figures 1 et 3.

25 Sur les figures 1 et 3, on a également représenté les séquences d'acides nucléiques codant respectivement pour RAP1A et RAP2.

30 Les protéines RAP1A et RAP2 consistent respectivement en des séquences peptidiques de 184 et 183 acides aminés, y compris la méthionine initiale, et ont un poids moléculaire calculé respectif de 20.900 et 20.700d.

3) Homologies entre les protéines RAP1A et RAP2 et les protéines Dras-3, K-ras, ral et R-ras :

35

Les homologies entre d'une part la protéine RAP1 et, d'autre part, la protéine Dras-3 de la drosophile et les protéines K-ras, ral et R-ras sont respectivement de 66,5%, 53%, 44% et 41%.

En ce qui concerne la région la plus conservée des protéines ras, de l'acide aminé 1 à 84, les pourcentages sont de 78,5% pour la protéine Dras-3 de la drosophile, 59,5% pour K-ras, 56% pour ral et 63% pour R-ras.

Une comparaison globale cellulaire pour la protéine RAP2 conduit à une homologie de 48% avec Dras-3 de la drosophile, 46% avec K-ras, 38% avec ral et 37% avec R-ras.

Lorsqu'on ne considère que les 84 premiers acides aminés ces pourcentages sont de 63 pour Dras-3, 52 K-ras et ral, 56% pour R-ras.

On a représenté sur la figure 5 les alignements des protéines RAP1A et RAP2 avec la protéine humaine K-ras (exon 4B) et la protéine Dras-3 de la drosophile. La numérotation de référence est celle de la protéine K-ras.

Sur cette figure 5 les régions de fixation du GTP sont encadrées. La région de l'effecteur est soulignée par 1 trait continu et la région d'attachement à la membrane intracellulaire est soulignée en pointillés.

Quatre domaines impliqués dans le site de liaison aux nucléotides à guanine des protéines ras (Barbacid, M. (1987) Annual Review of Biochemistry, 56, 779-827) et correspondant aux séquences d'acides aminés 10 à 17, 57 à 63, 113 à 120 et 143 à 147 sont hautement conservés parmi les protéines RAP, K-ras et Dras-3.

Les protéines RAP1A et RAP2 comme la protéine Dras-3 ont une threonine en position 61 à la place d'une glutamine présente dans toutes les protéines ras et les protéines voisines des protéines ras, non oncogènes, connues à ce jour.

Le domaine des résidus 32 à 42, pour les protéines ras - qui correspond au domaine impliqué dans l'interaction avec un effecteur - est identique dans la protéine RAP1A et ras, et diffère d'un amino acide dans la protéine RAP2 par rapport à la protéine ras.

La région C-Terminale des protéines ras est caractérisée par la séquence Cys-A-A-X, dans laquelle A est un amino acide aliphatique et X l'acide C-Terminal (Powers et al., (1984) Cell, 36, 607-612). Cette séquence est nécessaire pour la liaison lipidique posttraductionnelle et l'ancrage dans la membrane du plasma (Fujiyama et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1266-1270).

5) Transcription des gènes RAP1A et RAP2 :

La transcription des gènes RAP1A et RAP2 est effectuée par transfert d'ARN sur membrane après électrophorèse sur gel selon la technique désignée par "Northern Blot". Les conditions utilisées pour le "Northern Blot" sont rappelées ci-après dans le paragraphe intitulé "Matériels et méthodes".

Avec une sonde provenant de RAP1A, on met en évidence trois séquences d'ARN (c'est-à-dire trois transcripts) respectivement de 1.600, 2.700 et 5.400 nucléotides.

Avec une sonde provenant de RAP2, on met en évidence trois séquences d'ARN, respectivement de 2.200, 2.500 et 4.600 nucléotides.

La sonde provenant de RAP1A est un polynucléotide délimité par le fragment PstI-BglII de la séquence (19) et dont la première extrémité, correspondant à la restriction par PstI, est représentée sur la figure 7, et la deuxième extrémité correspondant à la restriction par BglII, se trouve 520 paires de base à droite de la première extrémité.

La sonde provenant de RAP2 est un polynucléotide délimité par le fragment HindII-PstI de la séquence 21 et dont la première extrémité correspondant à la restriction par HindII est représentée sur la figure 9 et la deuxième extrémité, correspondant à la restriction par PstI, est située 340 paires de base à droite de la première extrémité.

On a représenté sur la figure 6, l'étude des transcripts de RAP1A (colonne 1) et de RAP2 (colonne 2) après électrophorèse et transfert d'ARNm polyA+ extrait de lymphocytes humains. La taille des différents ARN est mentionnée sur la gauche en kilobase.

6) Matériels et méthodes : clonage et séquençage des ADNc de RAP1A et RAP2 :

Pour identifier les ADNc de RAP, on a criblé une banque humaine, construite dans le phage λ gt10, avec un insert d'EcoRI de 700 paires de base du clone d'ADNc Dras-3 de la drosophile (Schetjer et al., (1985) EMBO J., 4, 407-412). On a effectué l'hybridation dans des conditions faiblement stringentes : à savoir hybridation à 60°C dans 5 x SSC, 5 x Denhardt, 0,1% SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon. Le dernier lavage est effectué

dans 2 x SSC et 0,1% SDS à 60°C pendant environ 15 mn.

5 Les conditions fortement stringentes utilisées pour l'hybridation croisée des inserts EcoRI sont les suivantes :

on effectue l'hybridation dans les conditions suivantes : 5 x SSC, 5 x Denhardt, 0,1% SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon à 65°C.

10 Le lavage est effectué de 0,1% SSC et 0,1% SDS à 65°C pendant 30 mn.

La séquence nucléotidique de l'insert complet d'EcoRI des clones RAP1A et RAP2 est déterminée en utilisant les vecteurs M13 par la méthode de terminaison de chaîne par dideoxy nucléotide (Messing, J. (1983) Methods Enzymol., 101, 20-78).

7) Analyse Northern et Southern Blot :

La technique désignée par "Southern Blot" est effectuée comme décrit dans l'article de Southern, E. (1975) J. Mol. Biol., 98, 503. 10 µg d'ADN placentaire humain digéré avec des endonucléases de restriction sont soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8%, transférés sur filtre de nitrocellulose et hybridés avec l'insert de EcoRI de chacun des clones RAP1A et RAP2.

25 On effectue l'hybridation dans les conditions suivantes : 5 x SSC, 5 x Denhardt, 0,1% SDS et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon à 65°C.

Le lavage est effectué à l'aide de 0,1% SSC et 0,1% SDS à 65°C pendant 30 mn.

30 En ce qui concerne la technique désignée par "Northern Blot" pour déterminer les séquences d'ARN, on prépare des ARN cytoplasmiques à partir de lymphocytes périphériques du sang (Perry et al., (1972) BBA, 262, 220-226).

35 On fractionne 5 µg d'ADN polyA+ sur des gels de formaldéhyde et d'agarose à 1%, avant le transfert

sur des membranes de nylon (commercialisées sous le nom de Pall), et on hybride les filtres avec les sondes provenant de RAP1A et de RAP2, définies précédemment.

5 Toutes les sondes sont marquées avec ^{32}P par la technique d'initiation au hasard (Amersham) pour obtenir une activité d'environ 3×10^8 CPM/ μg . On effectue les hybridations dans de la formamide à 50% à 42°C selon la méthode décrite dans l'article de
10 Maniatis et al., (1982) Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory.

EXEMPLE 2: CLONAGE ET SEQUENCAGE DE RAP1B:

On utilise l'insert du cDNA de RAP1A pour cribler une banque de cDNA humaine préparée dans le
15 phage λ gt10.

L'insert RAP1A est marqué au ^{32}P et permet d'identifier un phage dont l'insert (de 2100 pb), après sous-clonage, est séquencé.

20 La séquence d'acides nucléiques et la séquence d'acides aminés codée par cet acide nucléique sont représentées sur la figure 2.

La recherche d'homologie d'une part entre cette séquence d'acides aminés et les protéines RAP1A et RAP2, montre que cette séquence d'acides aminés a
25 une homologie de 95% par rapport à RAP1A et 61% par rapport à RAP2.

Cette séquence d'acides aminés sera par la suite désignée par RAP1B. Elle présente un poids moléculaire calculé de 20 800 d.

30 EXEMPLE 3: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP1A DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION BACTERIEN:

a) On sous-clone l'ADNc de RAP1A en vue de son amplification, dans le vecteur PUC8, au site EcoRI.

Après culture, on extrait l'ADNc et on le soumet à l'enzyme de restriction Bgl2, puis à EcoRI, et on récupère ainsi un fragment d'ADN qui correspond à la région complète codant pour la protéine RAP1A.

Le fragment EcoRI/Bgl2 est cloné dans le phage M13Mp11 aux sites BamHI et EcoRI, ce qui permet, après culture du phage, de récupérer l'ADN simple brin.

On effectue une mutagenèse dirigée en utilisant un oligonucléotide de synthèse de séquence suivante: 5' CAGATCACATATGCGTGAGTAC 3', cet oligonucléotide étant préalablement phosphorylé par la polynucléotide kinase.

On introduit ainsi un site NDE1 en amont de l'ATG correspondant à l'initiation de la protéine RAP1A.

On prépare ensuite des recombinants de M13Mp11. Pour ce faire, on coupe par l'enzyme de restriction NDE1 l'ADN double brin de M13Mp11 et on répare le site NDE1 à l'aide de l'enzyme de Klenow.

On coupe ensuite par l'enzyme de restriction HindIII. Le fragment ainsi obtenu est alors lié au vecteur M13Mp11 coupé par EcoRI-HindIII, le site EcoRI du susdit vecteur ayant été réparé par l'enzyme de Klenow avant ligation.

On effectue une mutagenèse dirigée en utilisant l'oligonucléotide de synthèse de séquence suivante phosphorylé par la polynucléotide kinase: 5' CCAGTGAATTCTATGCGTGAG 3'

Cet oligonucléotide permet d'insérer un C au site de ligation de M13Mp11 et de RAP1A et reconstituer ainsi un site EcoRI. On obtient ainsi le phage M13Mp11 contenant la séquence RAP1A.

L'insert RAP1A pourra être isolé en coupant le phage aux sites EcoRI et HindIII.

5 b) On prépare ensuite de l'ADN double brin de M13Mp11. On coupe par EcoRI et HindIII pour préparer l'insert RAP1A en vue du clonage dans un vecteur d'expression bactérien.

10 On utilise par exemple comme vecteur d'expression celui qui est décrit dans l'article Tucker et al., EMBO J., vol. 5, 6, p. 1351-1358 (1986). Plus précisément, le vecteur utilisé est le vecteur ptac-cHras.

15 Le vecteur ptac-Hcras peut être obtenu à partir du vecteur pKM-tacI selon la construction décrite dans le susdit article de Tucker. Quant au vecteur pKM-tacI, il peut être obtenu selon la construction décrite dans l'article de Hermann A. De Boer et al., PNAS, vol. 80, p. 21-25, janvier 1983.

20 Le vecteur ptac-Hcras est soumis à l'enzyme de restriction HindIII, puis à EcoRI, de façon partielle afin de garder un fragment d'environ 300 paires de base EcoRI-EcoRI qui contient le promoteur tac inductible.

25 On insère dans le vecteur ainsi préparé, le fragment EcoRI-HindIII de RAP1A et on effectue une ligation. A l'aide du vecteur obtenu, on transforme ensuite une souche de E. coli, telles que celles connues sous la désignation de PRI Δ M15, ou HB101 - vecteur PDMI.

30 c) On procède ensuite à l'expression de la protéine RAP1A de la façon suivante.

A partir d'une culture qui dure environ 12 heures, on fait un ensemencement avec 1/100e du milieu de culture et on laisse pousser environ 3

heures en induisant ultérieurement environ 12 heures avec de l'IPTG, à une concentration de 50 μ M.

On récupère ensuite la protéine RAP1A exprimée par la souche de E. coli selon des techniques classiques. Cette protéine se présente sous forme soluble.

EXEMPLE 4: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP1A MUTEE EN POSITION 61 DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION:

On procède comme indiqué au paragraphe a) de l'exemple 3 c'est-à-dire jusqu'à l'obtention d'un phage M13Mp11 contenant la séquence RAP1A clonées aux sites EcoRI et HindIII.

L'ADN simple brin du phage M13Mp11 est préparé par mutagénèse dirigée en utilisant les oligonucléotides de synthèse suivants phosphorylés par la polynucléotide kinase:

5' GAT-ACT-GCA-GGG-CAA-GAG 3' (A) (pour transformer la threonine "61" en glutamine)

5' GAT-ACT-GCA-GGG-GTA-GAG 3' (B) (pour transformer la threonine "61" en valine)

On introduit ainsi en position 61, une glutamine à la place de la threonine dans le cadre de l'oligonucléotide (A) et une valine à la place de la threonine dans le cadre de l'oligonucléotide (B).

Les ADN double brin respectifs de chacune des deux séquences RAP1A modifiées comme indiqué ci-dessus sont alors préparés, puis coupés par les enzymes EcoRI et HindIII, puis cloné dans le vecteur d'expression comme indiqué au paragraphe .b) de l'exemple 3.

L'obtention des deux protéines modifiées est effectuée suivant le paragraphe c) de l'exemple 3.

EXEMPLE 5: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP1A MUTEE EN POSITION 35 DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION:

On procède comme indiqué à l'exemple 4. La mutagenèse dirigée est effectuée en utilisant l'oligonucléotide de synthèse suivant phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' TAT GAC CCA GCG ATA GAA GAT 3'

pour transformer la thréonine "35" en alanine.

EXEMPLE 6: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP1A MUTEE EN POSITION 12 DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION:

On procède comme indiqué à l'exemple 4. La mutagenèse dirigée est effectuée en utilisant l'oligonucléotide de synthèse suivant phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' CTT GGT TCA GTA GGC GTT 3'

pour transformer la glycine "12" en valine.

EXEMPLE 7: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP1A MUTEE EN POSITION 17 DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION:

On procède comme indiqué à l'exemple 4. La mutagenèse dirigée est effectuée en utilisant l'oligonucléotide de synthèse suivant phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' CGT TGG GAA GAA TGC TCT GAC A 3'

pour transformer la sérine "17" en asparagine.

EXEMPLE 8: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP1A MUTEE EN POSITION 168 DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION:

On procède comme indiqué à l'exemple 4. La mutagenèse dirigée est effectuée en utilisant l'oligonucléotide de synthèse suivant phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' GAT AAA TAG GTA AAC ACC AGT 3'

pour introduire un codon stop à la place de la lysine 168.

EXEMPLE 9: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP1B DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION:

On clone le fragment EcoRI-KpNI du fragment
5 RAP1B dans le phage M13Mp11 aux sites EcoRI et BamHI.

On effectue une mutagenèse dirigée en utilisant un oligonucléotide de synthèse suivant phosphorylé par la polynucléotide kinase:

10 5' AAG CTT GCA TAT GCG TGA GT 3'

et on introduit ainsi un site NDE1 en amont de l'ATG correspondant à l'initiation de la protéine RAP1B.

On prépare ensuite des recombinants de M13Mp11. Pour ce faire, on coupe par l'enzyme de restriction
15 NDE1, l'ADN double brin de M13Mp11 et on répare le site de NDE1 à l'aide de l'enzyme de Klenow.

On coupe ensuite par l'enzyme de restriction HindIII. On effectue ensuite une ligation du fragment obtenu au vecteur M13Mp11 coupé par EcoRI-
20 HindIII, le site EcoRI du susdit vecteur ayant été réparé par l'enzyme de Klenow avant ligation.

On effectue ensuite une mutagenèse dirigée pour introduire un C au site de ligation de M13Mp11 et de RAP1B. Le site EcoRI est ainsi reconstitué. Cette
25 mutagenèse dirigée est effectuée à l'aide de l'oligonucléotide de synthèse de séquence suivante phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' CCA GTG AAT TCT ATG CGT GAG 3'

On obtient ainsi le phage M13Mp11 contenant la
30 séquence RAP1B. L'insert RAP1B peut être isolé en coupant le phage aux sites EcoRI et HindIII et inséré dans un vecteur d'expression tel que le vecteur ptac. L'obtention de la protéine RAP1B est effectuée comme indiqué au paragraphe c) de
35 l'exemple 3.

EXEMPLE 10: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP2 MUTEE EN POSITION 12 DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION BACTERIEN:

On procède comme indiqué au paragraphe a) de l'exemple 3, c'est-à-dire jusqu'à l'obtention du phage M13Mp11 contenant la séquence RAP2 clonée aux sites EcoRI et HindIII.

L'oligonucléotide de synthèse suivante phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' CGG AGG GCA TAT GCG CGA GTA 3'

est utilisé pour introduire un site NDE1,

et l'oligonucléotide de séquence suivante phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' CCA GTG AAT TCT ATG CGC GAG 3'

est utilisé pour insérer un C au site de ligation de M13Mp11 et de RAP1A et reconstituer ainsi un site EcoRI.

L'ADN simple brin du phage M13Mp11 est préparé par mutagénèse dirigée en utilisant les oligonucléotides de synthèse suivant phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' GCT GGG CTC GGT CGG GGTA GGC A 3'

pour transformer la glycine "12" en valine.

L'ADN double brin de la séquence RAP2 modifiée comme indiqué ci-dessus est préparé, puis coupé par les enzymes EcoRI et HindIII, puis cloné dans le vecteur d'expression ptac32 décrit dans "Biochemical Properties of Ha-ras Encoded p21 Mutants and Mechanism of the Autophosphorylation Reaction" (The Journal of Biological Chemistry, vol. 263, N° 24, p. 11792-11799, 1988), comme indiqué au paragraphe b) de l'exemple 3.

L'obtention de la protéine modifiée dans une souche de E. coli, telles que celles connues sous la

désignation de PRI Δ M15 ou HB101 + PDMI, est effectuée suivant le paragraphe c) de l'exemple 3.

EXEMPLE 11: PRODUCTION DE LA PROTEINE RAP2 MUTEE EN POSITION 35 DANS UN VECTEUR D'EXPRESSION BACTERIEN:

A partir du phage M13Mp11 contenant la séquence RAP2 clonée aux sites EcoRI et HindIII, obtenu comme indiqué à l'exemple précédent, l'ADN simple brin du phage M13Mp11 est préparé par mutagenèse dirigée en utilisant les oligonucléotides de synthèse suivant phosphorylé par la polynucléotide kinase:

5' TAC GAC CCC GCC ATC GAG GAC 3'

pour transformer la thréonine "35" en alanine.

L'obtention de la protéine modifiée est effectuée comme indiqué à l'exemple précédent.

EXEMPLE 12: EXPRESSION DU GENE RAP1A OU DU GENE RAP2 DANS LE VECTEUR VETR-RAP1A ET VETR-RAP2:

1) On a fait exprimer respectivement le gène RAP1A et le gène RAP2 dans un vecteur d'expression de type rétrovirus construit de la façon suivante à partir du vecteur initial A*.

Le vecteur A* est une modification du vecteur A, dans lequel le site EcoRI de PBR322 a été détruit.

Ce vecteur A été obtenu par ligation du fragment de 4,5 Kb HindIII-EcoRI du virus de Harvey (nucléotides 3495-2540) (Soeda, E. et Yasuda, S. (1985), RNA Tumor Viruses: Molecular Biology of Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., Second edition, pp. 928-939), au fragment de 3,3 Kb EcoRI-BamHI de ce même virus (nucléotides 2540-378). Après ligation, le fragment viral a été inséré entre les sites HindIII et BamHI de pBR 322.

Le vecteur initial A* est représenté par un cercl sur les Figures 12a), 12b) et 12c).

5 Sur la Figure 12a) on a représenté le fragment SacII/EcoRI du vecteur initial A* par un trait fort en regard duquel on a dessiné (à l'intérieur du vecteur) un arc de cercle en pointillés.

10 On coupe le vecteur initial A* par EcoRI et on fait agir l'enzyme de Klenow pour obtenir des bouts francs. Le site EcoRI est ainsi détruit et est représenté dans la suite par EcoRI barré d'une croix soit ~~EcoRI~~.

On coupe ensuite par SacII et on récupère le fragment SacII/~~EcoRI~~ de 1600 pb.

15 2) Sur la Figure 12b), on a représenté le fragment PstI/SacII du vecteur A* par un trait fort, en regard duquel on a dessiné (à l'intérieur du vecteur) un arc de cercle en traits pleins.

20 On coupe le vecteur initial A* par PstI et SacII pour récupérer le fragment PstI/SacII de 3736 pb.

25 3) Sur la Figure 12c), on a représenté le fragment PstI/HindIII du vecteur A* par un trait fort, en regard duquel on a dessiné (à l'intérieur du vecteur) un arc de cercle en pointillés:traits pleins-points.

30 On coupe le vecteur initial A* par HindIII; on fait agir l'enzyme de Klenow pour obtenir des bouts francs, puis on coupe par PstI. Le site HindIII est ainsi détruit et est représenté dans la suite du texte par ~~HindIII~~.

On récupère le fragment PstI/~~HindIII~~ de 5626 pb.

4) On effectue ensuite la ligation des fragments suivants obtenus respectivement en 1), 2) et 3) ci-dessus:

- 5 - SacII/~~EcoRI~~
- PstI/SacII
- PstI/~~HindIII~~

pour obtenir la construction intermédiaire représentée sur la figure 12d).

10 Dans cette construction intermédiaire, le fragment compris entre HindIII d'une part et ~~EcoRI/HindIII~~ d'autre part contient une séquence désignée par "enhancer", ou séquence stimulatrice, représentée par "E" sur la figure 12d).

15 5) On coupe la construction intermédiaire par PstI/HindIII. On récupère le fragment PstI/HindIII de 6345 pb contenant d'une part la LTR3' (qui servira pour le site de polyadénylation de l'ARN) et d'autre part la région de l'"enhancer".

20 Le susdit fragment est représenté par un trait fort, sur la figure 12e), en regard duquel on a dessiné (à l'intérieur du vecteur) des points selon un arc de cercle.

6) On utilise un autre vecteur, désigné par J'.

25 Ce vecteur J' est obtenu à partir du vecteur A* et diffère du vecteur A* par les deux éléments suivants:

30 - la mutation en position 12 n'existe plus; le fragment viral de 51bp HindIII/PvuII (nucléotide 1088-1139) a été remplacé par le fragment correspondant du gène cellulaire Ha-ras de souris (Lacal et al. (1984): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, p. 5305-5309).

35 - le site SacII présent dans le virus de Harvey à la position 940 a été remplacé par un site EcoRI.

5 A partir du vecteur J', on isole le fragment contenant la LTR5'. Pour ce faire, le vecteur J' est coupé par PstI/EcoRI et on isole le fragment PstI/EcoRI de 2305 pb représenté par un trait sur la figure 12f), en regard duquel on a dessiné (à l'intérieur du vecteur) de petits triangles pleins, selon un arc de cercle.

10 7) les inserts EcoRI/HindIII de RAP1A sous-clonés dans pUC8 ou de RAP2 sous-clonés dans pUC8 sont ensuite liés aux fragments HindIII/PstI de 6345 pb obtenu (comme indiqué au paragraphe 5 ci-dessus) et provenant du vecteur appelé "construction intermédiaire" et PstI/EcoRI provenant du vecteur J' (cf. paragraphe 6 ci-dessus) de 2305 pb.

15 Résultats:

On a fait exprimer les vecteurs d'expression décrits ci-dessus et contenant respectivement RAP1A et RAP2 dans différentes lignées cellulaires normales ou transformées, notamment par RAS ou par d'autres oncogènes.

20 EXEMPLE 13: EXPRESSION DU GENE RAP1A OU DU GENE RAP2 DANS LE VECTEUR PJ3Q:

25 Ce vecteur est décrit dans Land, H.A., Chen, C., Morgenstern, J.P., Parada, L.F., et Weinberg, R.A., Mol. Cell Biol. 6:1917-1925, 1986.

Pour RAP1A, le clonage dans le vecteur PJ3Q se fait à partir de l'insert EcoRI/Bgl2 obtenu à partir de l'ADNc complet de RAP1A cloné directement dans le vecteur PJ3Q aux sites EcoRI/Bgl2 de ce vecteur.

30 Pour RAP2, comme il n'existe pas de site Bgl2, on utilise l'insert provenant de l'ADNc de RAP2 coupé aux sites EcoRI/PstI, cloné dans le plasmide pUC8. A partir de cette construction on ressort le fragment EcoRI/HindIII, ayant 670 pb.

35

On coupe le susdit plasmide pUC8 contenant RAP2 par HindIII et on répare par l'enzyme de Klenow pour obtenir des bouts francs, puis on coupe par EcoRI.

5 Le site HindIII est détruit et sera dans la suite désigné par Hind~~III~~.

L'insert EcoRI/Hind~~III~~ (réparé par la Klenow) est isolé sur gel d'agarose.

10 Le vecteur PJ3Q est coupé au site Bgl2 réparé par la Klenow pour obtenir des bouts francs, puis coupé par EcoRI.

Le site Bgl2 est détruit et sera désigné dans la suite par Bgl~~2~~.

15 L'insert RAP2 (EcoRI/Hind~~III~~) et le vecteur PJ3Q coupé aux sites Bgl~~2~~/EcoRI sont ensuite soumis à une ligation.

Résultats:

20 On fait exprimer RAP1A et RAP2 clonés dans le vecteur PJ3Q comme décrit ci-dessus respectivement dans différentes lignées cellulaires normales ou transformées, notamment par RAS ou par d'autres oncogènes.

25 On a également effectué le clonage inversé respectivement de RAP1A et RAP2 dans le vecteur PJ3Q, aux sites HindIII/EcoRI.

Pour RAP1A, l'insert EcoRI/HindIII obtenu à partir du sous-clonage de RAP1A dans pUC8 est lié au vecteur PJ3Q coupé aux sites HindIII/EcoRI.

30 Pour RAP2, l'insert EcoRI/HindIII obtenu à partir du sous-clonage de RAP2 dans pUC8 est lié au vecteur PJ3Q coupé aux sites HindIII/EcoRI.

Le clonage inversé de RAP1A et RAP2 dans le vecteur PJ3Q permet l'obtention d'ARN messenger antisens qui, par hybridation avec les ARN messagers

des gènes RAP1A et RAP2 endogènes, peuvent inhiber la synthèse protéique.

Ce vecteur peut permettre l'expression des protéines RAP soit après transfection, soit par infection, le vecteur ayant préalablement été encapsidé à l'aide d'un virus "associé" ("helper").

EXEMPLE 14: EXPRESSION DU GENE RAP1A, DU GENE RAP1B ET DU GENE RAP2 DANS LE VECTEUR PEX V3:

Ce vecteur est décrit dans Miller, J., et Germain, R.N., J. Exp. Med. 164:1478-1489, 1986.

Pour le clonage de RAP1A, ainsi que celui de RAP1B et RAP2, le vecteur PEX V3 est coupé par l'enzyme EcoRI.

Les inserts EcoRI des ADNc complets respectivement de RAP1A, RAP1B et RAP2 sont directement clonés dans le vecteur PEX V3 coupé au site EcoRI.

Pour RAP1A, l'insert est de 1,4 kb, pour RAP1B, l'insert est de 2,1 kb, et pour RAP2, l'insert est de 950 pb.

La bonne orientation dans le vecteur, c'est-à-dire celle compatible avec l'expression de la protéine, a été déterminée en effectuant différentes dégradations enzymatiques (par exemple BamHI et pstI) et par le séquençage de fragments de restriction incluant le site EcoRI de clonage.

On fait exprimer RAP1A, RAP1B et RAP2 respectivement dans différentes lignées cellulaires normales ou transformées.

On a également effectué le clonage selon l'orientation inverse à celle indiquée ci-dessus. Ceci permet d'obtenir un ARN transcrit comme indiqué à la fin de l'exemple 13.

EXEMPLE 15: EXPRESSION DU GENE RAP1A OU DU GENE RAP2 DANS LE VECTEUR P ZIP NEO:

5 Ce vecteur est décrit dans Constance, L. Cepho, Bryan, E. Roberts, et Richard, C. Mulligan. Cell, vol. 37: 1053-1062, 1984.

On clone RAP1A et RAP2 au site BamHI du susdit vecteur, lequel a été préalablement coupé par BamHI et réparé par la Klenow pour obtenir des bouts francs.

10 Le site BamHI est détruit et sera dans la suite désigné par ~~BamHI~~.

En ce qui concerne RAP1A, il est préalablement sous-cloné dans le plasmide pUC8.

15 L'ADNc est coupé par EcoRI/HindIII réparé par la Klenow (pour obtenir des extrémités à bouts francs). Les sites EcoRI et HindIII sont détruits et seront représentés par ~~EcoRI~~ et ~~HindIII~~. L'insert RAP1A (~~EcoRI/HindIII~~) réparé par la Klenow est lié par une ligase permettant de constituer le vecteur p Zip Neo de RAP1A. On oriente le vecteur (dans le sens permettant l'expression de la protéine) en effectuant différentes dégradations enzymatiques et en effectuant le séquençage aux sites de clonage.

20 Pour le clonage de RAP2, on procède comme indiqué à propos de RAP1A.

25 L'insert ~~EcoRI/HindIII~~ de RAP2, réparé par la Klenow est lié au vecteur P Zip Neo coupé en BamHI réparé par l'enzyme de Klenow.

30 On fait exprimer RAP1A et RAP2 clonés dans P Zip Neo respectivement dans différentes lignées cellulaires normales ou transformées.

EXEMPLE 16: EXPRESSION DU GENE RAP1A OU DU GENE RAP2 DANS LE VECTEUR DE LEVURE YEP51:

Ce vecteur est décrit dans Broach et al. (1983), Vectors for high - level inducible expression of cloned genes in yeast. In Experimental Manipulation of gene expression, M. Inouye, ed. (New York: Academic Press) pp. 83-177.

Le clonage est effectué de la façon suivante:

Le vecteur YEP51 est coupé par Sall réparé par la Klenow, puis coupé ensuite par HindIII.

Le site Sall est détruit et est désigné dans la suite par ~~Sall~~.

Le grand fragment ~~Sall~~/HindIII est purifié sur gel et sert au clonage.

En ce qui concerne RAP1A, l'insert utilisé provient de sous-clonage de l'ADNc de RAP1A (fragment EcoRI/Bgl2) dans le vecteur pUC8.

Cet insert est obtenu en coupant RAP1A sous-cloné dans le vecteur pUC8 par EcoRI, suivi d'une réparation par l'enzyme de Klenow, puis d'une coupure par HindIII. Le site EcoRI est détruit et est désigné par ~~EcoRI~~.

L'insert ~~EcoRI~~/HindIII est purifié puis lié au vecteur ~~Sall~~/HindIII.

Pour RAP2, on procède comme indiqué à propos de RAP1A.

On fait exprimer RAP1A et RAP2 clonés dans le vecteur YEP51

dans différentes souches de levure.

EXEMPLE 17: EXPRESSION DU GENE RAP1A OU DU GENE RAP2 DANS LE VECTEUR DE LEVURE PD2 E2

Le vecteur PD2 E2 est décrit dans la littérature.

Ce vecteur contient déjà un gène cloné dont on se débarrasse en coupant par HindIII, puis en purifiant sur un gel d'agarose pour isoler le vecteur de l'insert. Le vecteur est ensuite réparé par l'enzyme de Klenow pour obtenir des bouts francs. Les sites HindIII sont détruits.

Pour le clonage de RAP1A, on utilise l'insert provenant du sous-clonage du cDNA de RAP1A dans pUC8 (fragment EcoRI/Bgl2). Cet insert est obtenu en coupant pUC8 RAP1A aux sites HindIII et EcoRI et est traité par l'enzyme de Klenow pour obtenir des bouts francs.

Les sites HindIII et EcoRI sont détruits et désignés dans la suite par ~~EcoRI/HindIII~~.

On réalise ensuite la ligation de l'insert ~~EcoRI/HindIII~~ de RAP1A avec le susdit vecteur de levure.

Pour RAP2, on utilisé le même type de construction que pour RAP1A.

On fait exprimer RAP1A et RAP2 clonés dans le vecteur PD2E2 respectivement dans différentes souches de levure.

EXEMPLE 18 : DETERMINATION DE LA LOCALISATION CHROMOSOMIQUE CHEZ L'HOMME DES GENES RAP1A, RAP1B ET RAP2

1) Pour ce faire, on procède de la façon suivante:

- préparation des sondes d'ADNc.

Les ADNc RAP sont clonés dans le plasmide pUC8. Deux fragments différents sont utilisés pour la localisation respective de chaque gène (cf. figure 10).

Pour la localisation du gène RAP1A, on a utilisé deux sondes comprenant l'ADNc complet (1,4kb) ou sa partie 5' comprenant la région codante

(0,7kb). Les deux sondes utilisées pour RAP1B sont soit l'ADNc complet (2,1kb) soit la partie 5' (0,73kb).

5 Les deux sondes du gène RAP2 sont soit l'ADNc complet de 0,95kb soit le fragment de 0,66kb dans la partie 5'.

2) préparation des chromosomes :

Des préparations de chromosomes à haute
10 résolution sont obtenus à partir de culture de cellules de sang stimulées par la phytohemagglutinine de deux hommes sains après synchronisation au methothrexate selon Yunis et al. (Yunis, J.J., Sawyer, J.R., Ball, D.W.: Characterization of banding patterns of metaphase-
15 prophase G-banded chromosomes and their use in gene mapping. Cytogenet. Cell Genet., 22, 679-683, (1978).

3) Hybridation in situ:

20 Les sondes sont marquées selon le procédé d'amorces d'ADN aléatoires (Kit Amersham, U.K.) introduites par Feinberg et Vogelstein (Feinberg, A.P., Vogelstein, B.A.: technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high
25 specific activity. Anal. Biochem., 132, 6-13, 1983). En utilisant 20 $\mu\text{Ci}[\text{H}^3]\text{dCTP}$ pour 50ng d'ADNc, l'activité obtenue est de 0,5 à 2×10^8 cpm/ μg .

Ces sondes marquées sont utilisées à des concentrations de 20 à 80 ng/ml.

30 La technique d'hybridation décrite par Harper et Saunders (Harper, M.E., Saunders, G.F.: Localization of single copy DNA sequences on G banded human chromosomes by in situ hybridization. Chromosoma, 83, 431-439, 1981) est légèrement
35 modifiée selon la méthode de Caubet et al. (Caubet,

J.F., et al., Human proto-oncogene c-mos maps to 8q11. Embo J., 4, 2245-2248, 1985).

Les plaques recouvertes d'émulsion Kodak NTB2 sont exposées pendant une et deux semaines pour l'autoradiographie: des bandes G sont ensuite obtenues avec le colorant de Wright.

4) Résultats:

Deux inserts différents de chacun des gènes RAP1A, RAP1B et RAP2 sont utilisés respectivement pour l'hybridation in situ vis-à-vis des chromosomes humains pour confirmer les résultats de la figure 10. Seules les métaphases ne présentant pas plus de trois grains d'argent sur les chromosomes sont photographiées et analysées.

5) Localisation de RAP1A:

L'expérience faite soit avec la sonde de 1,4kb soit avec celle de 0,7kb révèle un amas unique de grains sur le chromosome 1p12-p13 (6% et 5,5% du nombre total) (tableau 1).

TABLEAU I

HYBRIDATION IN SITU DE RAP1A, RAP1B ET RAP2
SUR CHROMOSOMES HUMAINS

| SONDE | TAILLE | N° DES MITOSES | N° DES GRAINES | AMAS DE GRAINES | |
|-------|---------|-------------------|-------------------|-----------------|--------------------|
| | | | | sur chrom. 1 | sur chrom. 1p12p13 |
| rap1A | 1.4Kb | 143 | 246 | 44 (17.8%) | 15 (6%) |
| | 0.7Kb | 120 | 163 | 26 (15.9%) | 9 (5.5%) |
| | | | | sur chrom. 12 | sur chrom. 12q14 |
| rap1B | 2.1Kb | 195 | 292 | 43 (14.7%) | 21 (7.2%) |
| | 0.73Kb | 131 | 177 | 30 (16.9%) | 17 (9.6%) |
| | | | | sur chrom. 13 | sur chrom. 13q34 |
| rap2 | 0.950Kb | 138 | 200 | 26 (13%) | 13 (6.5%) |
| | 0.660Kb | 60 | 82 | 24 (29.2%) | 11 (13.4%) |

Aucun signal secondaire significatif n'est observé sur d'autres chromosomes (cf. figure 11a).

6) Localisation de RAP1B:

5 L'hybridation in situ avec la sonde de 2,1kb ou de 0,7kb montre une claire accumulation de grains (7,2% and 9,6% du total) sur le chromosome 12q14 (tableau 1).

10 Aucun autre amas de grains significatif n'est présent sur d'autres chromosomes (fig. 11b).

7) Localisation de RAP2:

15 Les deux sondes de 0,950kb et 0,660kb utilisés dans cette localisation montrent dans chaque cas le même amas de grains sur le chromosome 13q34 (6,5% et 13,4% du total (tableau 1).

Aucun autre signal mineur n'est visible sur d'autres chromosomes (figure 11c).

Conclusion:

20 On n'a constaté ni hybridation, ni signal secondaire sur les autres chromosomes.

25 En ce qui concerne le chromosome 1p12-p13, aucun délétion spécifique n'est associée à une néoplasie particulière. Quelques translocations de cette région sont décrites dans les mélanomes et divers désordres sanguins (Bloomfield, C.D., trent, J.M., Van Den Berghe, H.: Report of the committee on structural chromosome changes in neoplasia (HGM10), Cytogenet. Cell. Genet. 46, 344-366, 1987).

30 On peut constater une proximité voisine apparente 1p12p13 du gène N-ras, situé également sur le chromosome.

35 En ce qui concerne la localisation du gène RAP1B sur le chromosome 12q14, des ruptures sont décrites à la fois dans les néoplasmes bénins et malins suivants:

- lipomes (Heim et al., Reciprocal translocation t(3;12)(q27;q13) in lipoma. Cancer Genet. Cytogenet., 23, 301-304, 1986);

5 - liposarcomes myxoides (Turc-Carel et al., Cytogenetic studies of adipose tissue tumors. II. Recurrent reciprocal translocation t(12;16)(q13;p11); in myxoid liposarcomas, Cancer Genet. Cytogenet. 23, 291-299, 1986);

10 - adénomes pleomorphiques (Bullerdiek et al., Rearrangements of chromosome region 12q13-q15 in pleomorphic adenomas of the human salivary gland (PSA). Cytogenet. Cell Genet., 45, 187-190, 1987 et Mark et al., Cytogenetical observations in 100 human
15 benign pleomorphic adenomas: specificity of the chromosomal aberrations and their relationship to sites of localized oncogenes. Anticancer Res., 6, 299-308, 1986) et

20 - leiomyomes (Heim et al., A rearrangement between chromosomal regions 12q13-q15 and 14q22.24, t(12;14)(q13-15;q22-24), may be found in leiomyomas of the uterus (HGM9, Abstracts). Cytogenet. Cell Genet., 46, 628, 1987).

25 En ce qui concerne la localisation du gène RAP2, sur le chromosome 13q34, aucune délétion spécifique n'est associée à des néoplasies et quelques délétions dans cette région sont décrites dans le cancer sporadique du sein.

30

35

REVENDICATIONS

1. Séquence d'acides aminés caractérisée en ce qu'elle contient l'un au moins des enchaînements d'acides aminés suivants:

MREYKLVVL (I)

ALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQCMLEIL (II)

10 QFTAMRDLYMKNQGQGFALVYSITAQSTFNDLQDLREQILRVKDTEDVPM (III)

EDERVVGKEQGQNLARQWCNCAFL (IV)

15 SKINVNEIFYDLVRQINRKTPVEKKKPKKKSCLLL (V)

ALTVQFVQGIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDAQQCMLEIL (VII)

QFTAMRDLYMKNQGQGFALVYSITAQSTFNDLQDLREQILRVKDTDDVPMI (VIII)

20 EDERVVGKEQGQNLARQWNNCAFL (IX)

SKINVNEIFYDLVRQINRKTPVPGKARKKSSCQLL (X)

MREYKVVVL (XI)

25 ALTVQFVTGTFTIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSPSVLEIL (XII)

QFASMRDLYIKNGQGFILVYSLVNQQSFQDIKPMRDQIIRVKRYEKVPVI (XIII)

30 ESEREVSSSEGRALAEWGCPEM (XIV)

SKTMVDELFAEIVRQMNYAAQPDKDDPCCSACNIQ (XV)

2. Séquence d'acides aminés selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient

35

les cinq enchaînements d'acides aminés I, II, III, IV, et V, définis à la revendication 1.

5 3. Séquence d'acides aminés selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient les cinq enchaînements d'acides aminés VII, VIII, IX, et X, définis à la revendication 1.

10 4. Séquence d'acides aminés selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient les cinq enchaînements d'acides aminés XI, XII, XIII, XIV, et XV, définis à la revendication 1.

15 5. Séquence d'acides aminés, selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient l'enchaînement d'acides aminés XVI, représenté sur la figure 1 ou est constituée par cet enchaînement d'acides aminés.

20 6. Séquence d'acides aminés, selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient l'enchaînement d'acides aminés XVI représenté sur la figure 2, ou est constituée par cet enchaînement d'acides aminés.

25 7. Séquence d'acides aminés, selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient l'enchaînement d'acides aminés XVIII représenté sur la figure 3, ou est constituée par cet enchaînement d'acides aminés.

30 8. Séquence d'acides aminés caractérisée en ce qu'elle contient l'un au moins des enchaînements d'acides aminés codés par les enchaînements nucléotidiques suivants :

ATG CGT GAG TAC AAG CTA GTG GTC CTT (1)

GCT CTG ACA GTT CAG TTT GTT CAG GGA ATT TTT GTT GAA
AAA TAT GAC CCA ACG ATA GAA GAT TCC TAC AGA AAG CAA

GTT GAA GTC GAT TGC CAA CAG TGT ATG CTC GAA ATC CTG
(2)

5 CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTG TAT ATG AAG AAC GGC
CAA GGT TTT GCA CTA GTA TAT TCT ATT ACA GCT CAG TCC
ACG TTT AAC GAC TTA CAG GAC CTG AGG GAA CAG ATT TTA
CGG GTT AAG GAC ACG GAA GAT GTT CCA ATG ATT
(3)

10 GAA GAT GAG CGA GTA GTT GGC AAA GAG CAG GGC CAG AAT
TTA GCA AGA CAG TGG TGT AAC TGT GCC TTT TTA (4)

TCA AAG ATC AAT GTT AAT GAG ATA TTT TAT GAC CTG GTC
AGA CAG ATA AAT AGG AAA ACA CCA GTG GAA AAG AAG AAG
CCT AAA AAG AAA TCA TGT CTG CTG CTC
15 (5)

ATG CGT GAG TAT AAG CTA GTC GTT CTT (6)

GCT TTG ACT GTA CAA TTT GTT CAA GGA ATT TTT GTA GAA
20 AAA TAC GAT CCT ACG ATA GAA GAT TCT TAT AGA AAG CAA
GTT GAA GTA GAT GCA CAA CAG TGT ATG CTT GAA ATC TTG
(7)

CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTA TAC ATG AAA AAT GGA
CAA GGA TTT GCA TTA GTT TAT TCC ATC ACA GCA CAG TCC
25 ACA TTT AAC GAT TTA CAA GAC CTG AGA GAA CAG ATT CTT
CGA GTT AAA GAC ACT GAT GAT GTT CCA ATG ATT
(8)

GAA GAT GAA AGA GTT GTA GGG AAG GAA CAA GGT CAA AAT
30 CTA GCA AGA CAA TGG AAC AAC TGT GCA TTC TTA (9)

TCA AAA ATA AAT GTT AAT GAG ATC TTT TAT GAC CTA GTG
CGG CAA ATT AAC AGA AAA ACT CCA GTG CCT GGG AAG GCT
CGC AAA AAG TCA TCA TGT CAG CTG CTT
35 (10)

ATG CGC GAG TAC AAA GTG GTG GTG CTG (11)

5 GCC CTG ACC GTG CAG TTC GTG ACC GGC ACC TTC ATC GAG
AAA TAC GAC CCC ACC ATC GAG GAC TTC TAC CGC AAG GAG
ATC GAG GTG GAT TCG TCG CCG TCG GTG CTG GAG ATC CTG
(12)

10 CAG TTC GCG TCC ATG CGG GAC CTG TAC ATC AAG AAC GGC
CAG GGC TTC ATC CTC GTC TAC AGC CTC GTC AAC CAG CAG
AGC TTC CAG GAC ATC AAG CCC ATG CGG GAC CAG ATC ATC
CGC GTG AAG CGG TAT GAG AAA GTG CCA GTC ATC
(13)

15 GAA AGT GAG AGA GAA GTA TCG TCC AGC GAA GGC AGA GCC
CTT GCT GAA GAG TGG GGC TGC CCC TTT ATG (14)

20 AGT AAA ACA ATG GTG GAC GAA CTC TTT GCA GAA ATT GTG
AGG CAG ATG AAC TAT GCT GCT CAG CCT GAC AAA GAT GAC
CCA TGC TGT TCT GCA TGT AAC ATA CAA
(15)

9. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il
contient l'un au moins des enchaînements de
nucléotides codant pour les séquences d'acides
aminés selon les revendications 1 à 7.

25 10. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il
contient l'un au moins des enchaînements de
nucléotides suivants :

ATG CGT GAG TAC AAG CTA GTG GTC CTT (1)

30 GCT CTG ACA GTT CAG TTT GTT CAG GGA ATT TTT GTT GAA
AAA TAT GAC CCA ACG ATA GAA GAT TCC TAC AGA AAG CAA
GTT GAA GTC GAT TGC CAA CAG TGT ATG CTC GAA ATC CTG
(2)

35

CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTG TAT ATG AAG AAC GGC
CAA GGT TTT GCA CTA GTA TAT TCT ATT ACA GCT CAG TCC
ACG TTT AAC GAC TTA CAG GAC CTG AGG GAA CAG ATT TTA
CGG GTT AAG GAC ACG GAA GAT GTT CCA ATG ATT
(3)

GAA GAT GAG CGA GTA GTT GGC AAA GAG CAG GGC CAG AAT
TTA GCA AGA CAG TGG TGT AAC TGT GCC TTT TTA (4)

TCA AAG ATC AAT GTT AAT GAG ATA TTT TAT GAC CTG GTC
AGA CAG ATA AAT AGG AAA ACA CCA GTG GAA AAG AAG AAG
CCT AAA AAG AAA TCA TGT CTG CTG CTC
(5)

ATG CGT GAG TAT AAG CTA GTC GTT CTT (6)

GCT TTG ACT GTA CAA TTT GTT CAA GGA ATT TTT GTA GAA
AAA TAC GAT CCT ACG ATA GAA GAT TCT TAT AGA AAG CAA
GTT GAA GTA GAT GCA CAA CAG TGT ATG CTT GAA ATC TTG
(7)

CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTA TAC ATG AAA AAT GGA
CAA GGA TTT GCA TTA GTT TAT TCC ATC ACA GCA CAG TCC
ACA TTT AAC GAT TTA CAA GAC CTG AGA GAA CAG ATT CTT
CGA GTT AAA GAC ACT GAT GAT GTT CCA ATG ATT
(8)

GAA GAT GAA AGA GTT GTA GGG AAG GAA CAA GGT CAA AAT
CTA GCA AGA CAA TGG AAC AAC TGT GCA TTC TTA (9)

TCA AAA ATA AAT GTT AAT GAG ATC TTT TAT GAC CTA GTG
CGG CAA ATT AAC AGA AAA ACT CCA GTG CCT GGG AAG GCT
CGC AAA AAG TCA TCA TGT CAG CTG CTT
(10)

ATG CGC GAG TAC AAA GTG GTG GTG CTG (11)

35

GCC CTG ACC GTG CAG TTC GTG ACC GGC ACC TTC ATC GAG
AAA TAC GAC CCC ACC ATC GAG GAC TTC TAC CGC AAG GAG
ATC GAG GTG GAT TCG TCG CCG TCG GTG CTG GAG ATC CTG
(12)

5

CAG TTC GCG TCC ATG CGG GAC CTG TAC ATC AAG AAC GGC
CAG GGC TTC ATC CTC GTC TAC AGC CTC GTC AAC CAG CAG
AGC TTC CAG GAC ATC AAG CCC ATG CGG GAC CAG ATC ATC
CGC GTG AAG CGG TAT GAG AAA GTG CCA GTC ATC
(13)

10

GAA AGT GAG AGA GAA GTA TCG TCC AGC GAA GGC AGA GCC
CTT GCT GAA GAG TGG GGC TGC CCC TTT ATG (14)

15

AGT AAA ACA ATG GTG GAC GAA CTC TTT GCA GAA ATT GTG
AGG CAG ATG AAC TAT GCT GCT CAG CCT GAC AAA GAT GAC
CCA TGC TGT TCT GCA TGT AAC ATA CAA
(15)

20

11. Acide nucléique selon la revendication 10,
caractérisé en ce qu'il contient les cinq
enchaînements de nucléotides (1), (2), (3), (4) et
(5), définis à la revendication 10.

25

12. Acide nucléique selon la revendication 10,
caractérisé en ce qu'il contient les cinq
enchaînements de nucléotides (6), (7), (8), (9) et
(10), définis à la revendication 10.

30

13. Acide nucléique selon la revendication 10,
caractérisé en ce qu'il contient les cinq
enchaînements de nucléotides (11), (12), (13), (14)
et (15), définis à la revendication 10.

35

14. Acide nucléique selon la revendication 10,
caractérisé en ce qu'il contient l'enchaînement de
nucléotides (16), délimité par les nucléotides
d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux
positions 43 et 594 de la figure 1, ou contient

l'enchaînement de nucléotides (19) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 605 de la figure 1.

15. Acide nucléique selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il contient l'enchaînement de nucléotides (17), délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 54 et 605 de la figure 2, ou contient l'enchaînement de nucléotides (20) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 838 de la figure 2.

16. Acide nucléique selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il contient l'enchaînement de nucléotides (18), délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 4 et 552 de la figure 3, ou comprend l'enchaînement de nucléotides (21) délimité par les nucléotides d'extrémité correspondant aux nucléotides situés aux positions 1 et 558 de la figure 3.

17. Acide nucléique recombinant caractérisé en ce qu'il contient l'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 9 à 16, inséré dans un acide nucléique hétérologue vis-à-vis du susdit fragment.

18. Vecteur recombinant en particulier pour le clonage et/ou l'expression particulièrement du plasmide, cosmide ou phage, caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique recombinant selon la revendication 17 contenant le susdit acide nucléique en un des sites non essentiels pour sa réplication.

35

19. Vecteur recombinant selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il contient en l'un de ses sites non essentiels pour sa répllication des éléments nécessaires pour promouvoir l'expression d'une séquence d'acides aminés selon les revendications 1 à 8, dans un hôte cellulaire, et éventuellement un promoteur compatible avec ledit hôte cellulaire, en particulier un promoteur inductible, et éventuellement une séquence signal et/ou une séquence d'ancrage.

20. Vecteur recombinant selon la revendication 19, en ce qu'il contient :

- les éléments permettant son insertion dans E. Coli,
- les éléments permettant l'expression par E. Coli de cet acide nucléique selon les revendications 9 à 17, inséré dans le vecteur, et
- les éléments permettant l'exportation du produit résultant de l'expression du susdit acide nucléique.

21. Hôte cellulaire transformé par un vecteur recombinant selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, capable de se répliquer dans ledit hôte cellulaire.

22. Hôte cellulaire selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'il s'agit de E. Coli transformé par le vecteur selon la revendication 20.

23. Anticorps, notamment monoclonal, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre une séquence d'acides aminés selon l'une quelconques des revendications 1 à 8.

24. Sonde nucléotidique caractérisée en ce qu'elle hybride avec l'un des acides nucléiques selon les revendications 9 à 17, ou avec leurs

séquences complémentaires dans les conditions d'hybridation suivantes :

5 - pour les sondes susceptibles de s'hybrider avec les acides nucléiques (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10), (12), (13), (14) et (15) ou leurs séquences complémentaires les conditions d'hybridation sont les suivantes :

10 hybridation proprement dite : 60°C, 5X SSC, 5X Denhardt, 0,1% SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon ; lavage : 60°C, 2X SSC, 0,1% SDS, 30 mn ;

15 - pour les sondes susceptibles de s'hybrider avec les acides nucléiques ou les séquences complémentaires (1), (6) et (11) les conditions d'hybridation sont les suivantes :

hybridation proprement dite : 45°C, 5X SSC, 5X Denhardt, 0,1% SDS, 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon ;

20 1° lavage : température ambiante, 2X SSC, 0,1% SDS, 30mn,

2° lavage : 45°C, 2X SSC, 0,1% SDS, 30 mn.

25 25. Méthode de dépistage in vitro des séquences d'acides aminés selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans un prélèvement biologique susceptible de les contenir, caractérisé en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'au moins un des anticorps selon la revendication 23, avec le susdit prélèvement biologique ;

30 - la détection à l'aide de tout moyen approprié des éventuels complexes immunologiques formés entre les séquences d'acides aminés et les anticorps sus-mentionnés.

35 26. Méthode de dépistage in vitro des séquences d'acides aminés selon l'une quelconque des

revendications 1 à 8, dans un prélèvement biologique susceptible de contenir des acides nucléiques codant pour lesdites séquences d'acides aminés, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 5 - la mise en contact d'au moins une des sondes oligonucléotidiques selon la revendication 24, avec le susdit prélèvement biologique préalablement traité ;
- 10 - la détection à l'aide de tout moyen approprié des éventuels complexes d'hybridation formés entre les sondes et les acides nucléiques sus-mentionnés.

27. Méthode de dépistage in vitro selon la revendication 25 ou 26, appliquée au diagnostic in vitro de maladies corrélées à des teneurs en séquences d'acides aminés, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes correspondant généralement à l'état physiologique d'un individu sain.

28. Nécessaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro selon les revendications 25 et 27 comprenant :

- 25 - une quantité déterminée d'au moins un des anticorps selon la revendication 23 susceptibles de donner lieu à une réaction immunologique avec une des séquences d'acides aminés à détecter selon les revendications 1 à 8 ;
- 30 - avantageusement, un milieu approprié à la formation d'une réaction immunologique entre les séquences d'acides aminés et les anticorps sus-mentionnés ;
- avantageusement des réactifs permettant la détection des complexes immunologiques entre les

séquences d'acides aminés et les anticorps produits lors de la susdite réaction immunologique.

5 29. Nécesssaire ou kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de dépistage in vitro selon la revendication 26 et 27 comprenant:

10 - une quantité déterminée d'au moins une des sondes oligonucléotidiques selon la revendication 24, susceptibles de donner lieu à une réaction d'hybridation avec un des acides nucléiques codant pour une séquence d'acides aminés à détecter selon les revendications 1 à 8 ;

15 - avantageusement un milieu approprié à la formation d'une réaction d'hybridation entre les acides nucléiques et les sondes sus-mentionnés ;

- avantageusement, des réactifs permettant la détection des complexes d'hybridation produits de la susdite réaction d'hybridation.

20 30. Procédé de préparation d'une séquence d'acides aminés selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que :

25 - on cultive dans un milieu de culture approprié un hôte cellulaire préalablement transformé par un vecteur approprié contenant un acide nucléique selon l'une des revendications 9 à 17,

30 - et on récupère à partir du susdit milieu de culture la séquence d'acides aminés produite par ledit hôte cellulaire transformé, après lyse de la membrane cellulaire de cet hôte cellulaire.

35 31. Procédé de préparation d'une séquence d'acides aminés déterminée caractérisé par la mise en culture de E. Coli contenant un vecteur recombinant selon la revendication 20 et par l'arrêt de la culture en fin de phase exponentielle de

croissance dudit E. Coli, et récupération de la
séquence d'acides aminés déterminée à partir du
milieu de culture exempt des autres protéines et
enzymes exocellulaires susceptibles d'être secretés
5 par E. Coli.

10

15

20

25

30

35

FIGURE 1a

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2/24

FIGURE 1b

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CCA | ATG | ATT | TTG | GTT | GGC | AAT | AAA | TGT | GAC | CTG | GAA | GAT | GAG | CGA | 414 |
| P | M | I | L | V | G | N | K | C | D | L | E | D | E | R | |
| GTA | GTT | GGC | AAA | GAG | CAG | GGC | CAG | AAT | TTA | GCA | AGA | CAG | TGG | TGT | 459 |
| V | V | G | K | E | Q | G | Q | N | L | A | R | Q | W | C | |
| AAC | TGT | GCC | TTT | TTA | GAA | TCT | TCT | GCA | AAG | TCA | AAG | ATC | AAT | GTT | 504 |
| N | C | A | F | L | E | S | S | A | K | S | K | I | N | V | |
| AAT | GAG | ATA | TTT | TAT | GAC | CTG | GTC | AGA | CAG | ATA | AAT | AGG | AAA | ACA | 549 |
| N | E | I | F | Y | D | L | V | R | Q | I | N | R | K | T | |
| CCA | GTG | GAA | AAG | AAG | AAG | CCT | AAA | AAG | AAA | TCA | TGT | CTG | CTG | CTC | 594 |
| P | V | E | K | K | K | P | K | K | K | S | C | L | L | L | |
| taggcccatat | | | | | | | | | | | | | | | 605 |

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3/24

FIGURE 2a

| | | | |
|---|-----|-----|---|
| 1 | 54 | ATG | M |
| gaartccagcgtgagaggttcgcagagtactaggttttgacaagccttgc | | | |
| CGT GAG TAT AAG CTA GTC GTT CTT GGC TCA GGA GGC GTT GGA AAG | 101 | | |
| R E Y K L V V L G S G G V G K | | | |
| TCT GCT TTG ACT GTA CAA TTT GTT CAA GGA ATT TTT GTA GAA AAA | 146 | | |
| S A L T V Q F V V Q G I F V E K | | | |
| TAC GAT CCT ACG ATA GAA GAT TCT TAT AGA AAG CAA GTT GAA GTA | 191 | | |
| Y D P T I E D S Y R K Q V E V | | | |
| GAT GCA CAA CAG TGT ATG CTT GAA ATC TTG GAT ACT GCA GGA ACG | 236 | | |
| D A Q Q C M L E I L D T A G T | | | |
| GAG CAA TTT ACA GCA ATG AGG GAT TTA TAC ATG ATG AAA AAT GGA CAA | 281 | | |
| E Q F T A M R D L Y M K N G Q | | | |
| GGA TTT GCA TTA GTT TAT TCC ATC ACA GCA CAG TCC ACA TTT AAC | 326 | | |
| G F A L V Y S I T A Q S T F N | | | |
| GAT TTA CAA GAC CTG AGA GAA CAG ATT CTT CGA GTT AAA GAC ACT | 371 | | |
| D L Q D L R E Q I L R V K D T | | | |
| GAT GAT GTT CCA ATG ATT CTT GTT GGT AAT AAG TGT GAC TTG GAA | 416 | | |
| D D V P M I L V G N K C D L E | | | |

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4/24

FIGURE 2b

GAT GAA AGA GTT GTA GGG AAG GAA CAA GGT CAA AAT CTA GCA AGA 461
 D E R V V G G K E Q Q G G Q N L A R
 CAA TGG AAC AAC TGT GCA TTC TTA GAA TCT TCT GCA AAA TCA AAA 506
 Q W N N C A F L E S S A K S K
 ATA AAT GTT AAT GAG ATC TTT TAT GAC CTA GTG CGG CAA ATT AAC 551
 I N V N E I F Y D L V R Q I N
 AGA AAA ACT CCA GTG CCT GGG AAG GCT CGC AAA AAG TCA TCA TGT 596
 R K T P V P G K A R K K S S C
 CAG CTG CTT taataactaaatgcattgtagctctgagccaggctctgaagaactgttgc 653
 Q L L
 ccaattcaacagtgccagcattccaactttgttaaacccatccaacatcttaaatggactt 713
 tcctgtggtggtaccctttaagagggcggtatgaaagctagctatatcagtttgcacattct 773
 aatcactttccagtatgagaagagagattttacaaattatataatagtccttagagtttgc 833
 agctg 838

FIGURE 3a

[illegible]

6/24

FIGURE 3b

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CTG | GAA | AGT | GAG | AGA | GAA | GTA | TCG | TCC | AGC | GAA | GGC | AGA | GCC | CTT | 405 |
| L | E | S | E | R | E | V | S | S | S | E | G | R | A | L | |
| GCT | GAA | GAG | TGG | GGC | TGC | CCC | TTT | ATG | GAA | ACT | TCC | GCT | AAG | AGT | 450 |
| A | E | E | W | G | C | P | F | M | E | T | S | A | K | S | |
| AAA | ACA | ATG | GTG | GAC | GAA | CTC | TTT | GCA | GAA | ATT | GTG | AGG | CAG | ATG | 495 |
| K | T | M | V | D | E | L | F | A | E | I | V | R | Q | M | |
| AAC | TAT | GCT | GCT | CAG | CCT | GAC | AAA | GAT | GAC | CCA | TGC | TGT | TCT | GCA | 540 |
| N | Y | A | A | Q | P | D | K | D | D | P | C | C | S | A | |
| TGT | AAC | ATA | CAA | tagcat | | | | | | | | | | | 558 |
| C | N | I | Q | | | | | | | | | | | | |

FEUILLE DE REMPLACEMENT

7/24

FIGURE 4



FIGURE 5

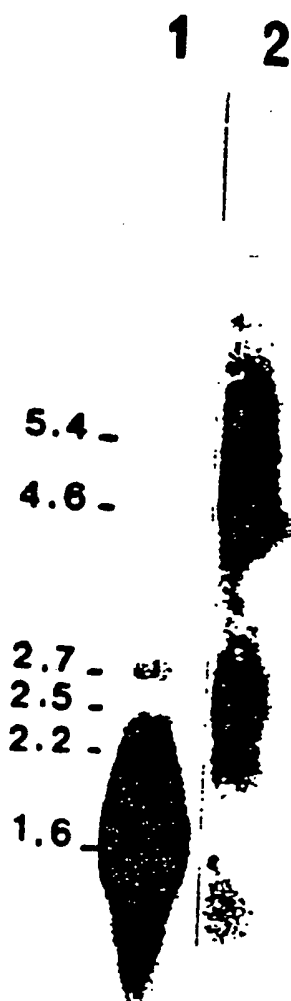
K-ras MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQ NHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDGET CLLDILD⁵¹DTAGQEEYSAMRDQYMRTG
 rap 1 MREYKLVVVGSGGVGKSALTVQFVQ GIFVEKYDPTIEDSYRKQVEVDCQQ CMLEILD⁵¹DTAGTEQFTAMRDLYMKNG
 rap 2 MREYKLVVVGSGGVGKSALTVQFVT GTFIEKYDPTIEDFYRKEIEVDSSP SVLEILD⁵¹DTAGTEQFASMRDLYIKNG
 Dras3 MREYKIVVVGSGGVGKSALTVQFVQ CIFVEKYDPTIEDSYRKQVKVNERQ CMLEIVN⁵¹TAGTEQFTAMRNLYMKNG

 76 101 126
 K-ras EGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQI KRVKDS¹⁰¹EDVPMVLVGNKCDL¹²⁶PS-RT VDTKQAQDLARSY-GIPFIETS^{8/24}AKT
 rap 1 QGFALVYSITAQSTFNDLQDLREQI LRVKDTEDVPMILVGNKCDL¹²⁶EDERV VGKEQGQNLARQWCNCAFL^{8/24}ESSAKS
 rap 2 QGFILVYSLVNQQSFQDIKPMRDQI IRVKRYEKVPVILVGNKVDL¹²⁶ESERE VSSSEGRALAE^{8/24}EW-GCPFMETS^{8/24}AKS
 Dras3 SDSC-WSTRSRNRRLTICRTREQI LRVKDTDDVPMVLVGNKCDL¹²⁶EEERV VGKELGKNLATQF-NCAFMETS^{8/24}AKA

 151 176
 K-ras RQGVDDAFYTLVREIRKHKEKMSKD GK¹⁵¹KKKKSKTKCVIM
 rap 1 KINVNETFYDLVRQINRKT¹⁷⁶PVEKKK PKKKS-----CLLL
 rap 2 KTMVDELFAEIVRQMNYAAQPD¹⁷⁶KDD PCCSA-----CNIQ
 Dra 3 KVNVDIFYDWSGRSTRSRPRNRR SRKVP-----¹⁷⁶CVLL-----

9/24 r

FIGURE 6



10/24
FIGURE 7a

[illegible]

FIGURE 7b

241 ATGAGGGATTTGTATATGAAGAACGGCCAGGTTTGGCACTAGTATATTCTATTACAGCT 300
 2-StyI 2-MaeI 1-DdeI
 1-HaeIII 1-SpeI 2-AluI
 1-CfrI V V V V V
 301 CAGTCCACGTTTAACGACTTACAGGACCTGAGGGAACAGATTTACGGGTTAAGGACACG 360
 1-MaeII 2-DdeI 1-SauI
 3-Sau96I 3-AvaII V V
 1-XmnI 1-MaeIII 2-BstNI
 V V V
 361 GAAGATGTTCCAATGATTTTGGTTGGCAATAAATGTGACCTGGAAGATGAGCGAGTAGTT 420

11/24

FIGURE 7c

2-HaeIII
4-Sau96I
V V

2-MaeIII
V

2-HinfI
V

421 GGCAAAGAGCAGGCCAGAAATTTAGCAAGACAGTGGTGTAACGTGCGCCTTTT TAGAATCT 480

1-Tth111I
3-BstNI
V

3-Sau3A
V

481 TCTGCAAAGTCAAAGATCAATGTTAATGAGATATTTTATGACCTGGTCAGACAGATAAAT 540

3-HaeIII
5-Sau96I

2-NlaIII
V

3-MaeI
V V

541 AGGAAACACCCAGTGGAAAGAGAGCCCTAAAGAAATCATGTCTGCTGCTCTAGGCC 600

601 CATAT

FIGURE 8a

1-EcoRI
 V
 1
 GAATTC
 1-MaeI
 1-ScaI
 1-RsaI
 V V
 1-AluI
 1-HindIII
 V V
 1-NlaIII
 V
 61
 AGTATAAGCTAGTCGTTCTTGGCTCAGGAGCGTTGGAAAGTCTGCTTTGACTGTACAAT
 2-MaeI
 2-AluI
 VV
 1-DdeI
 V
 2-RsaI
 V
 121
 TTGTTCAAGGAATTTTGTAGAAAAATACGATCCTACGATAGAAAGATTCTTATAGAAAGC
 1-Sau3A
 V
 1-HinfI
 V
 181
 AAGTTGAAGTAGATGCACAACAGTGATGCTTGAAATCTTGGATACTGCAGGAACGGAGC
 1-PstI
 V
 241
 AATTACAGCAATGAGGGATTATACATGA AAAATGGACAAGGATTGCAATTAGTTATT
 2-NlaIII
 V

13/24

14/24

FIGURE 8b

| | | |
|-----|--|-----|
| 301 | CCATCACAGCACAGTCCACATTTAACGATTTACAAGACCTGAGAGAACAGATTCTTCGAG | 360 |
| | <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div> 2-HinfI 2-DdeI 1-XmnI VV V </div> <div> 1-TaqI V </div> </div> | |
| 361 | TTAAGACACTGATGTTCCAATGATTCTTGTGGTAATAAGTGTGACTTGGAAAGATG | 420 |
| | <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div> 3-HinfI V </div> <div> 1-MaeIII V </div> </div> | |
| 421 | AAAGAGTTGTAGGGAAGGAACAAGGTCAAATCTAGCAAGACAATGGAACAACTGTGCAT | 480 |
| | <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div> 4-HinfI 3-DdeI V V </div> <div> 2-Sau3A 1-BglII 1-XhoII V </div> <div> 4-MaeI V </div> </div> | |
| 481 | TCTTAGAATCTTCTGCAAAATCAAAAATAAATGTTAATGAGATCTTTTATGACCTAGTGC | 540 |

FIGURE 8c

15/24

| | | | | | |
|-----------------------------------|---|---|---|---------------------------------|------------|
| <p>1-BstNI 1-PfIMI VV</p> | <p>4-AluI 2-BstNI 1-NsiI 4-DdeI V V V V</p> | <p>1-KpnI 1-NlaIV 3-RsaI 1-BanI V V V</p> | <p>6-AluI 5-MaeI 5-AluI 1-NheI VV V</p> | <p>2-PvuII 7-AluI V</p> | <p>600</p> |
| 541 | GGCAAATTAACAGAAAACTCCAGTGCCTGGGAAGGCTCGCAAAAGTCATCATGTCAGC | | | | |
| 601 | TGCTTTAATACTAAATGCATTGTAGCTCTGAGCCAGGTCTGAAGAACTGTTGCCCAATTC | | | | 660 |
| 661 | AACAGTGCCAGCATTCCAACTTTGTTAAACCATCCAACATCTTAAATGGACTTTCCTGTG | | | | 720 |
| 721 | GTGGTACCCCTTTAAGAGGCGGATGAAAGCTAGCTATATCAGTTTGCACATTCTAATCACT | | | | 780 |
| 781 | TTCCAGTATGAGAAGAGAGAGATTTTACAATTATATAATAGTCCTAGAGTTTGCAGCTG | | | | |

16/24

Figure 9a

1-RsaI
 1-FnuDI
 1-HinPI
 V V V
 1-Bsp1286
 1-BanII
 1-AvaI
 VV
 1
 ACGATGCGCGAGTACAAAGTGGTGGTCTGGGCTCGGGGGGTAGGCAATCCGCCCTG 60

1-BanI
 1-HpaII
 1-Cfr10I
 1-MaeIII 1-NlaIV 1-TaqI
 V V V V V
 61
 ACCGTGCAGTTCGTGACCGGCACCTTCATCGAGAAATACGACCCACCATCGAGGACTTC 120

3-TaqI
 1-Sau3A
 V V V
 1-HinfI
 V
 1-BstNI
 2-Sau3A
 1-XhoII
 V V
 121
 TACCGCAAGGAGATCGAGGTGGATTTCGTGCCCGTCGGTGGAGATCCTGGACACGGCG 180

17/24

Figure 9b

| | | | |
|---|-----------------|----------|-----|
| 2-Bsp1286 | 3-NlaIV | 2-BstNI | 240 |
| 2-NlaIV | 1-AvaII | 1-HaeIII | |
| 2-BanI | 1-NlaIII 2-RsaI | 1-CfrI | |
| V VV | 1-Sau96I | V V V | |
| 181 GGCACCGAGCAGTTCGCGTCCATGCGGACCTGTACATCAAGAACGGCCAGGCTTCATC | | | |
| | 3-NlaIV | 3-Sau3A | |
| | 1-AcuI | 4-NlaIV | |
| | 1-HindII | 2-AvaII | |
| | V | 2-Sau96I | |
| | 3-BstNI | 2-NlaIII | |
| | 1-AluI | V V V | |
| | V | V | |
| 241 CTCGTCTACAGCCTCGTCAACCGACGAGAGCTTCCAGGACATCAAGCCCATGCGGGACCAG | | | 300 |
| | 3-FnuDII | 3-AvaII | |
| | V | 3-Sau96I | |
| | | V | |
| 301 ATCATCCGCGTGAGCGGTATGAGAAAGTGCCAGTCATCTTGGTTGGGAACAAAGTGGAC | | | 360 |

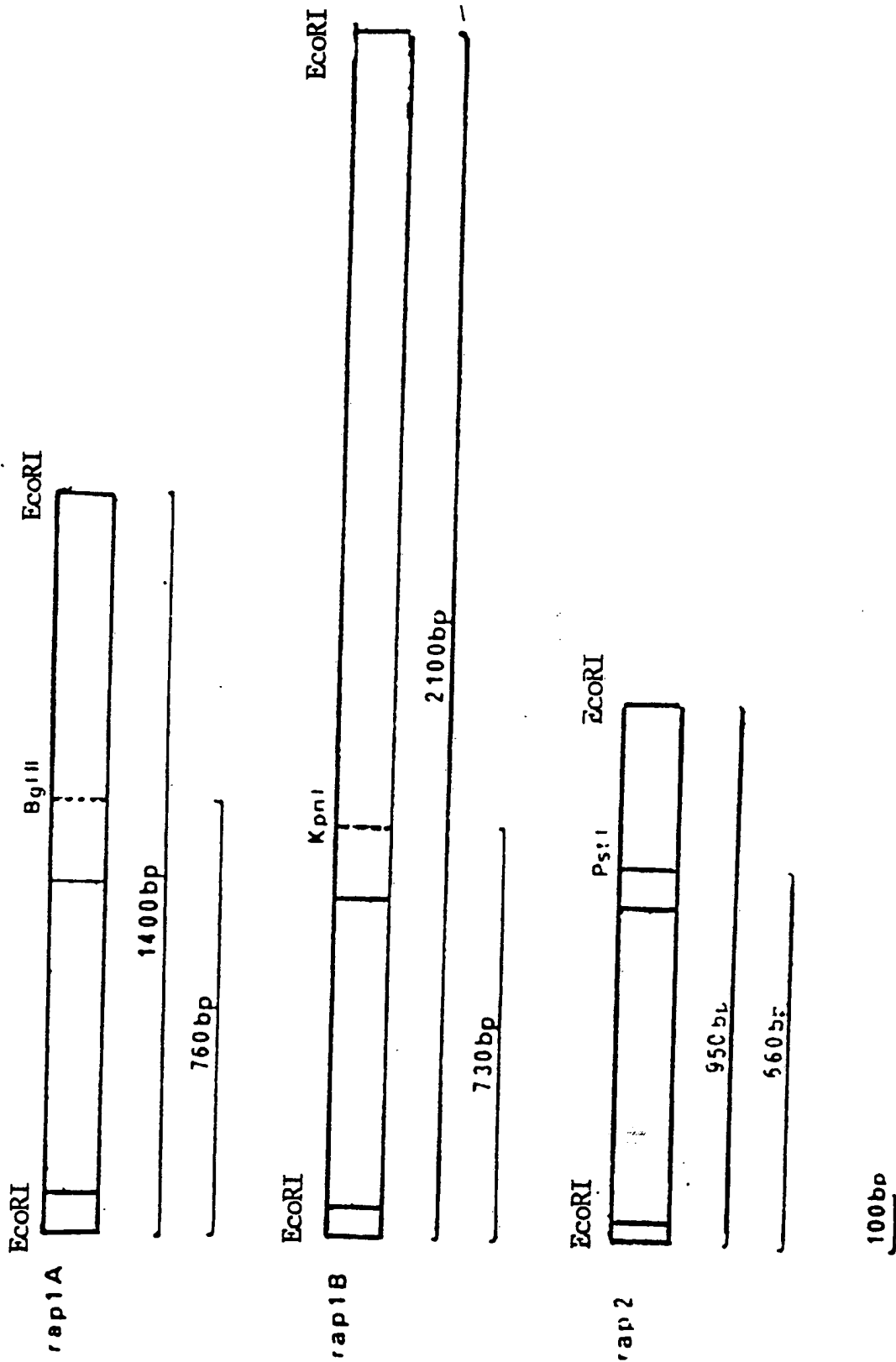
FIGURE 9c

18/24

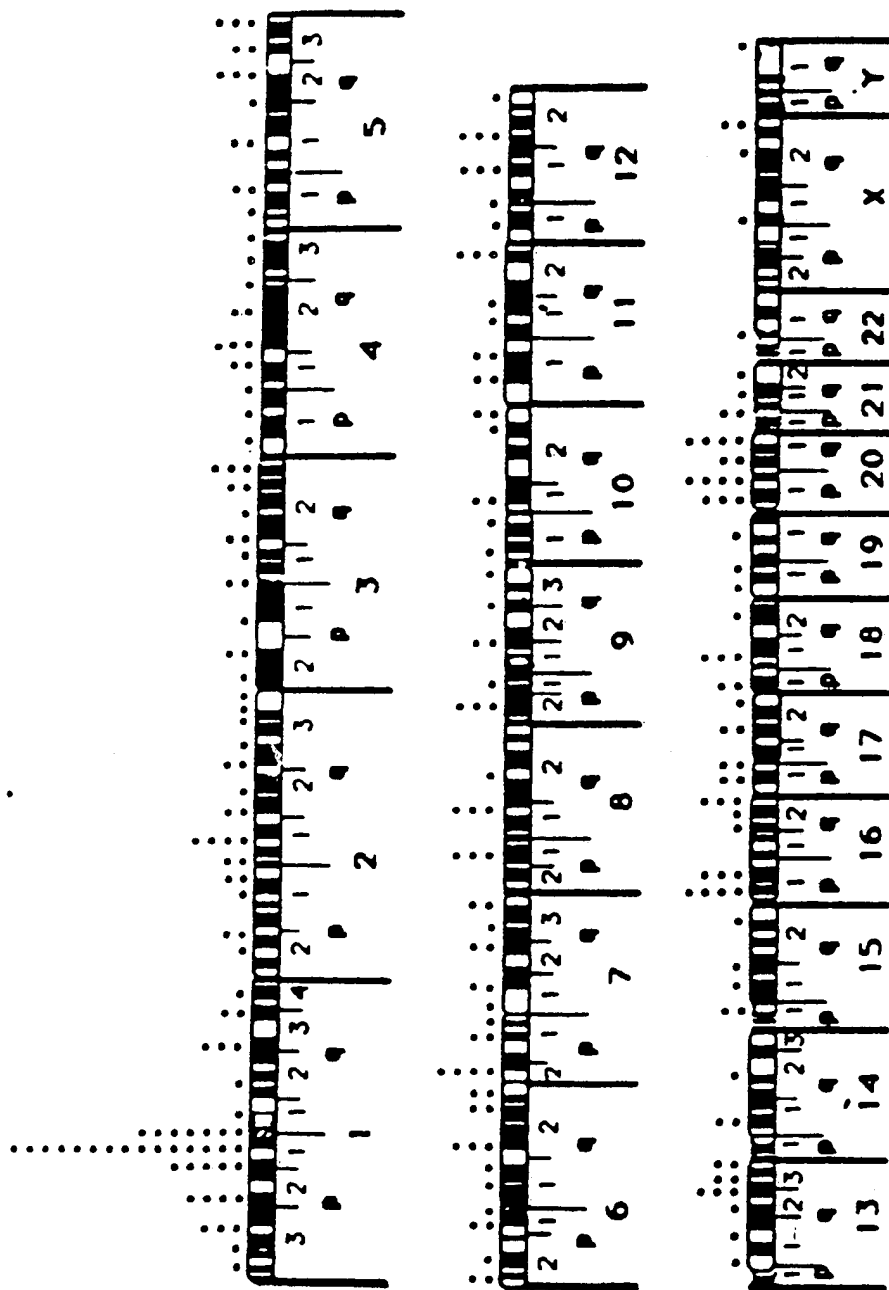
| | |
|---|---|
| <p>4-BstNI V</p> <p>361</p> | <p>3-Bsp1286 2-BanII V</p> <p>CTGGAAAGTGAGAGAGAAGTATCGTCCAGCGAAGGCAGAGCCCTTGCTGAAGAGTGGGGC</p> <p>420</p> |
| <p>1-DdeI V</p> <p>421</p> | <p>TGCCCCCTTTATGGAAACTTCGCTAAGAGTAAACAATGGTGGACGAACTCTTTCAGAA</p> <p>480</p> |
| <p>1-Nsp7524I 4-NlaIII 2-MaeIII VV</p> <p>541</p> | <p>2-DdeI V</p> <p>3-NlaIII V</p> <p>ATTGTGAGGCAGATGAACATATGCTGCTCAGCCTGACAAAGATGACCCATGCTGTTCTGCA</p> <p>540</p> |
| <p>TGTAACATACAATAGCAT</p> | |

19/24

FIGURE 10



a)rap 1A



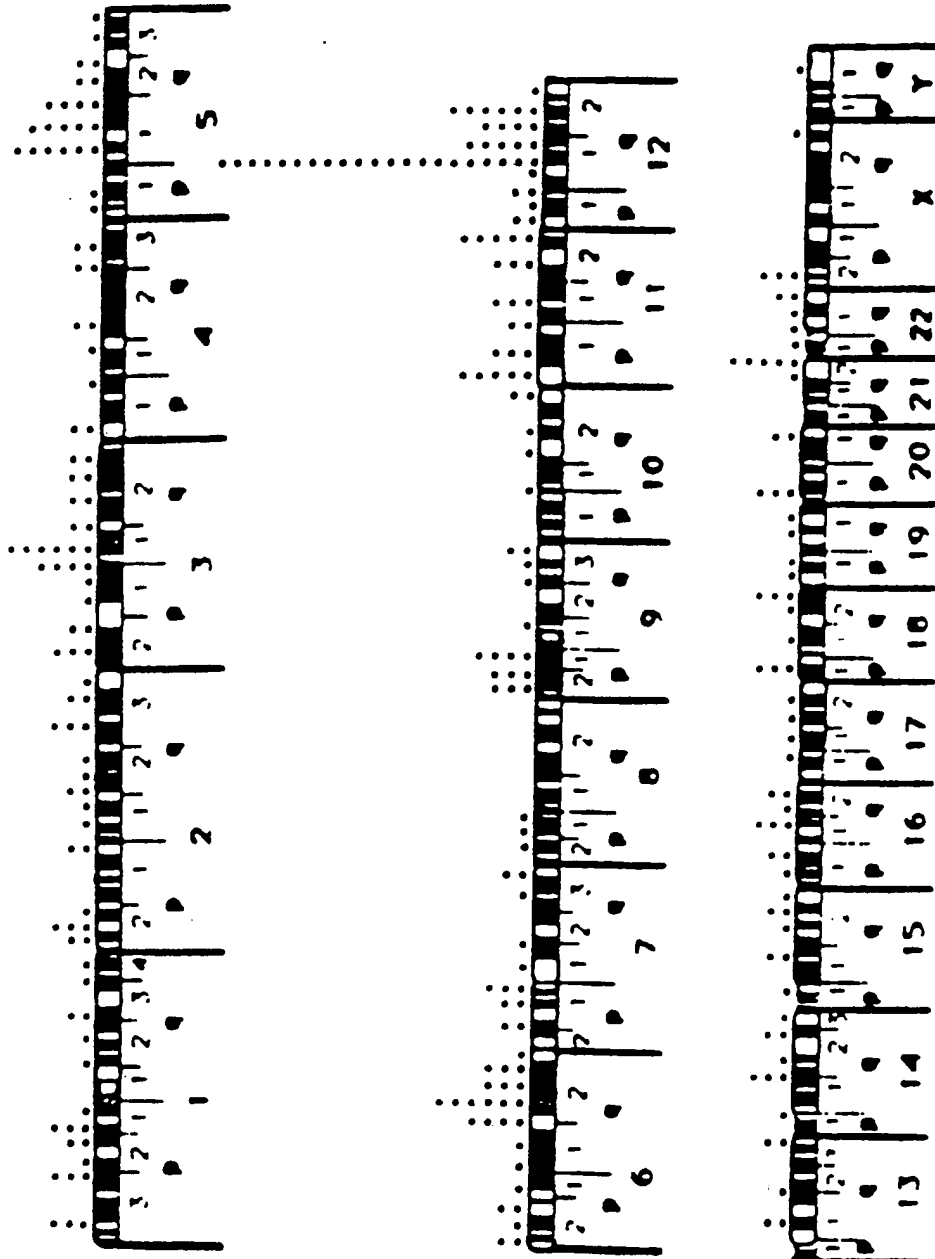


FIG. 11 b

b) rap 1B

FEUILLE DE REMPLACEMENT

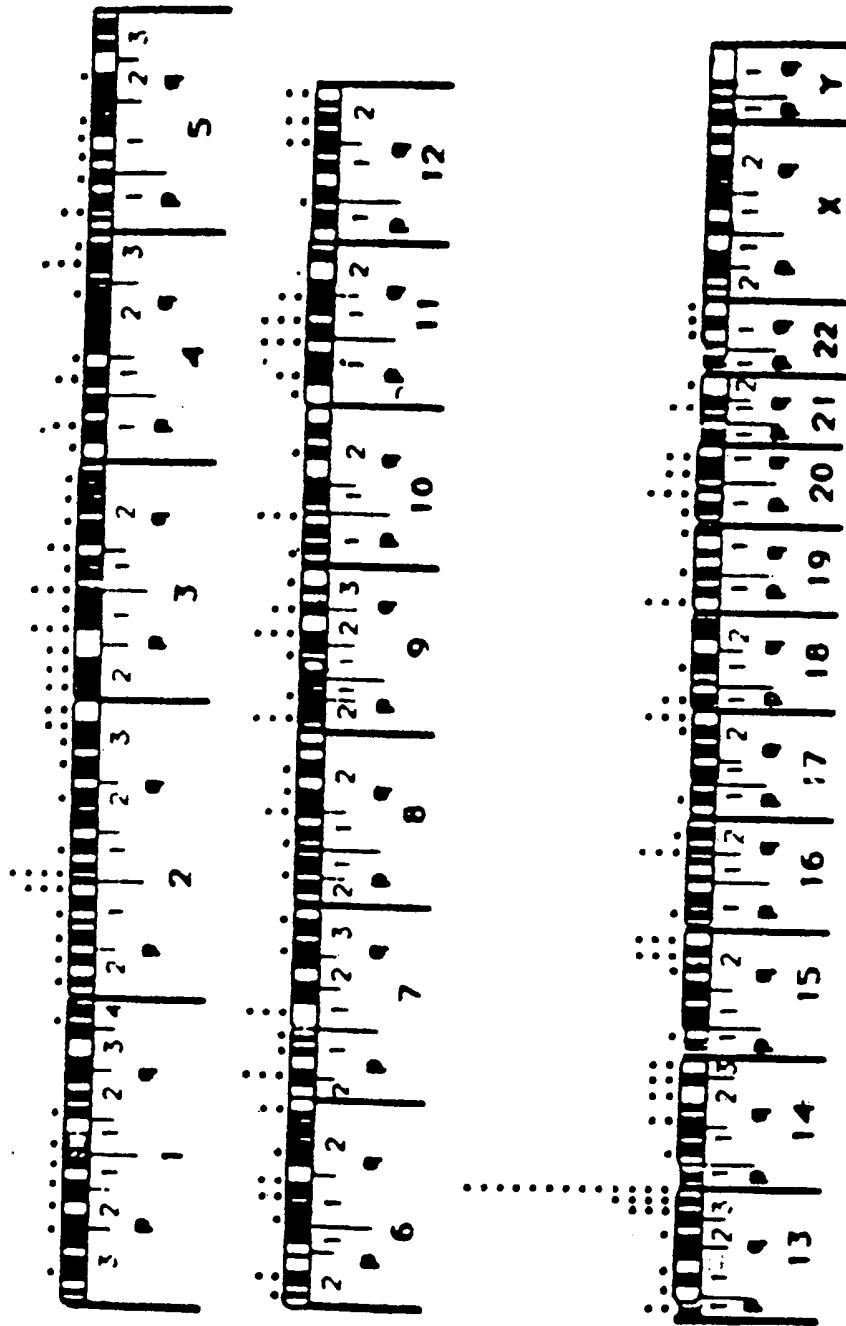


FIG. 11 c

c) rap 2

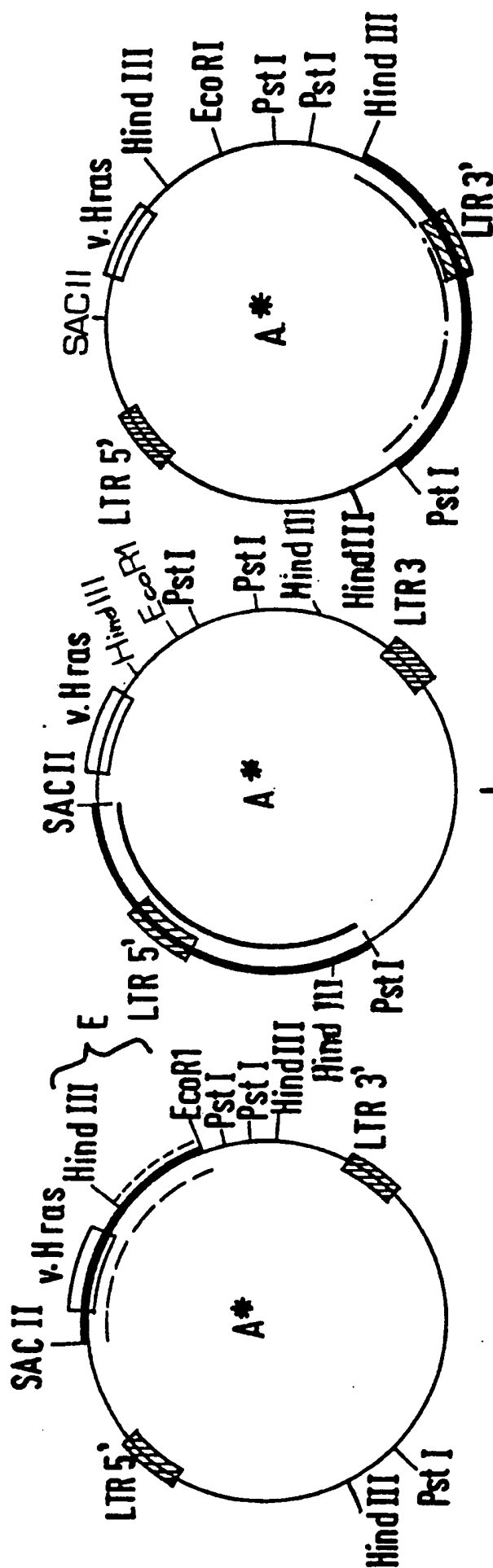


FIG.12c



FIG.12b

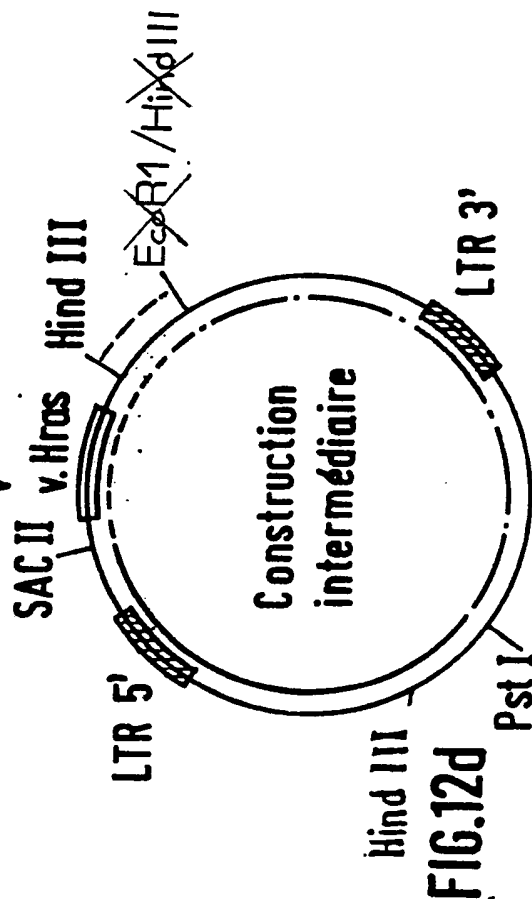


FIG.12d

